

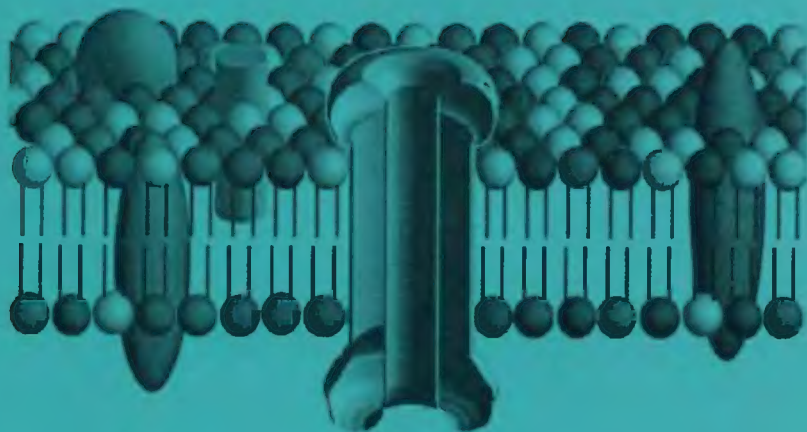
VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУНИВЕРСИТЕТ

З. И. КРУТЕЦКАЯ, О. Е. ЛЕБЕДЕВ, Л. С. КУРИЛОВА

**МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ
СИГНАЛИЗАЦИИ**



Санкт-Петербург - 2003

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУНИВЕРСИТЕТ

З.И. КРУТЕЦКАЯ, О.Е. ЛЕБЕДЕВ, Л.С. КУРИЛОВА

МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Милосердие

с каллиграфическим почерком

Зинг

Санкт-Петербург - 2003

УДК 577.352

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. Механизмы внутриклеточной сигнализации: Монография. - СПб.: Изд-во С. Петерб. Ун-та, 2003. 208 с., ил. 45, библиография 746 назв.

В монографии впервые в отечественной литературе обобщены современные литературные и собственные данные о структурно-функциональной организации известных в настоящее время клеточных сигнальных систем и составляющих их функциональных элементов. Рассматриваются аденилатциклазная, фосфоинозитидная, гуанилатциклазная и тирозинкиназная системы внутриклеточной сигнализации, а также участие в передаче сигнала арахидоновой кислоты, продуктов ее окисления и других жирных кислот.

Особое внимание уделено механизмам формирования Ca^{2+} -сигналов в клетках. Детально рассмотрены механизмы мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо и входа Ca^{2+} в клетки из наружной среды.

Книга предназначена для физиологов, биофизиков, биохимиков, занимающихся проблемами внутриклеточной сигнализации, а также специалистов смежных биологических и медицинских дисциплин.

Рецензент: доктор биологических наук Б.В. Крылов

1. Введение

В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов приема, переработки и передачи информации от плазматической мембраны клетки к внутриклеточным органеллам. Именно в плазматической мембране находятся механизмы, преобразующие внешние сигналы во внутриклеточные.

Восприятие клетками внешних сигналов в основном происходит благодаря взаимодействию этих факторов с определенными рецепторами, расположенными на поверхностной мембране клеток, которые распознают приходящие сигналы и приводят в действие внутриклеточные пути передачи информации, ведущие к запуску и регуляции различных клеточных процессов.

Передача сигнала через ряд посредников предполагает следующую схему реализации процесса: 1) взаимодействие рецептора со стимулом; 2) активация находящейся в мембране эффекторной молекулы, ответственной за генерацию вторичных посредников; 3) образование вторичных посредников; 4) активация посредниками белков-мишеней, в первую очередь протеинкиназ, вызывающих генерацию следующих посредников или активацию специализированных клеточных элементов, приводящих к физиологическому ответу; 5) исчезновение посредника.

Несмотря на огромное разнообразие стимулов, рецепторов и процессов, сопровождающих их взаимодействие, существует всего несколько универсальных сигнальных систем, передающих при взаимодействии стимула с рецептором информацию различным клеточным органеллам и запускающих определенные физиологические процессы в клетке. Сигнальные системы являются древнейшими системами, имеющимися у животных и растений.

В данной монографии обобщаются современные представления о структурно-функциональной организации известных в настоящее время клеточных сигнальных систем и составляющих их функциональных элементов.

2. Структурно-функциональная организация мембранных рецепторов

Фармакологические рецепторы осуществляют две различные, но тесно связанные функции. Во-первых, рецептор связывает специфический лиганд с высоким сродством и стереохимической специфичностью. Во-вторых, рецептор отвечает на связывание лиганда конформационным изменением, которое запускает трансмембранный сигнал. Это генерирующее сигнал конформационное изменение вызывается активными агонистами, а не чистыми антагонистами, которые могут

связываться с рецептором, но не активируют систему. Эти свойства отличают фармакологические рецепторы от других мембранных белков, таких как ионные каналы или переносчики питательных веществ. Для фармакологических рецепторов именно рецептор содержит в своей структуре ключевые элементы, которые генерируют клеточный ответ.

Выделяют три основных механизма рецептор-зависимой трансмембранной передачи сигнала: лиганд-регулируемый транспорт ионов; лиганд-регулируемые рецепторы-ферменты; лиганд-регулируемая активация цепочки рецептор-G-белок. В связи с этим выделяют три суперсемейства мембранных рецепторов: 1) лиганд-управляемые олигомерные ионные каналы типа канала никотинового ацетилхолинового рецептора, хлорных каналов ГАМК_A и глицинового рецепторов; 2) лиганд-управляемые трансмембранные ферменты, обладающие собственной тирозинкиназной активностью, подобны рецепторам для эпидермального фактора роста, фактора роста тромбоцитов, фактора роста нервов; 3) рецепторы, связанные с G-белками (см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992б; Лебедев, Крутецкая, 1994; см. моногр. Крутецкая, Лебедев, 1998).

2.1. Суперсемейство лиганд-управляемых рецепторов-каналов

Для суперсемейства лиганд-управляемых рецепторов канал имеет характерную пентамерную организацию вокруг расположенного в центре ионного канала. Так, никотиновый ацетилхолиновый рецептор является пентамером, состоящим из четырех различных, но гомологичных подструктур субъединиц: α (50 кДа), β (54 кДа), γ (56 кДа) и δ (58 кДа), связанных в стехиометрии $\alpha_2\beta\gamma\delta$ (рис. 1). Общая молекулярная масса рецептора 268 кДа. Каждая субъединица рецептора состоит из четырех гидрофобных сегментов (M1-M4), пронизывающих мембрану в виде спиралей (рис. 2). Предполагают, что в образовании лиганд-управляемого ионного канала принимают участие амфипатические M2-сегменты всех пяти субъединиц рецептора. Открывание канала происходит при связывании двух молекул лиганда (ацетилхолина) со связывающими участками на двух α -субъединицах. На α -субъединицах расположены также участки связывания α -бунгаротоксина, паралитического токсина и яда змей. Рецепторы для двух основных тормозных медиаторов центральной нервной системы, ГАМК и глицина, также являются пентамерами, образующими лиганд-управляемые хлорные каналы постсинаптической мемbrane (Hille, 1992, 2001; см. кн. Крутецкая, Лонский, 1994 и Лебедев, Крутецкая, 1994).

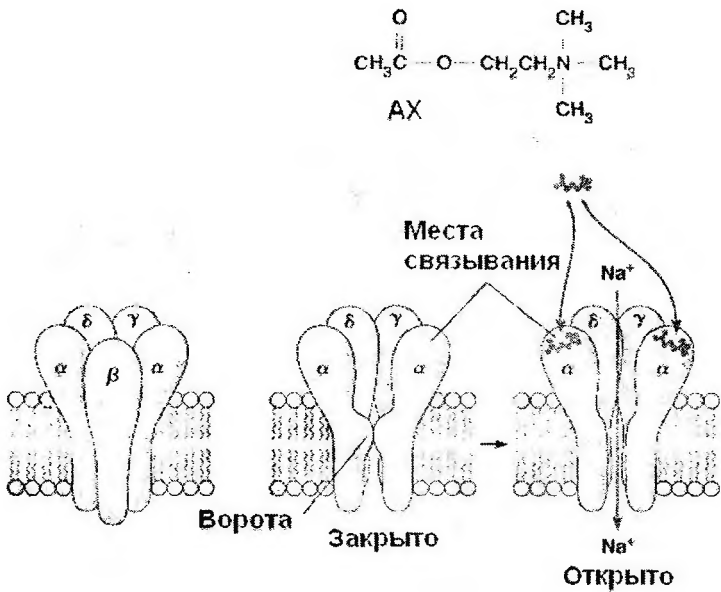


Рис. 1. Структура никотинового ацетилхолинового рецептора.

α , β , γ и δ - субъединицы рецептора. Открывание канала происходит при связывании двух молекул ацетилхолина (AX) со связывающими участками на двух α -субъединицах.

2.2. Суперсемейство рецепторов, связанных с G-белками

В настоящее время выделено и клонировано около 18 рецепторов млекопитающих, связанных с G-белками. Эти рецепторы включают четыре опсина. β_1 -адренорецептор. β_2 -адренорецептор, три α -адренергических рецептора, пять типов мускариновых рецепторов, серотониновые рецепторы, пять типов мускариновых рецепторов, серотониновые рецепторы 5HT-1a и 5HT-1c, рецептор дофамина (см. обз. Крутецкая. Лебедев. 19926).

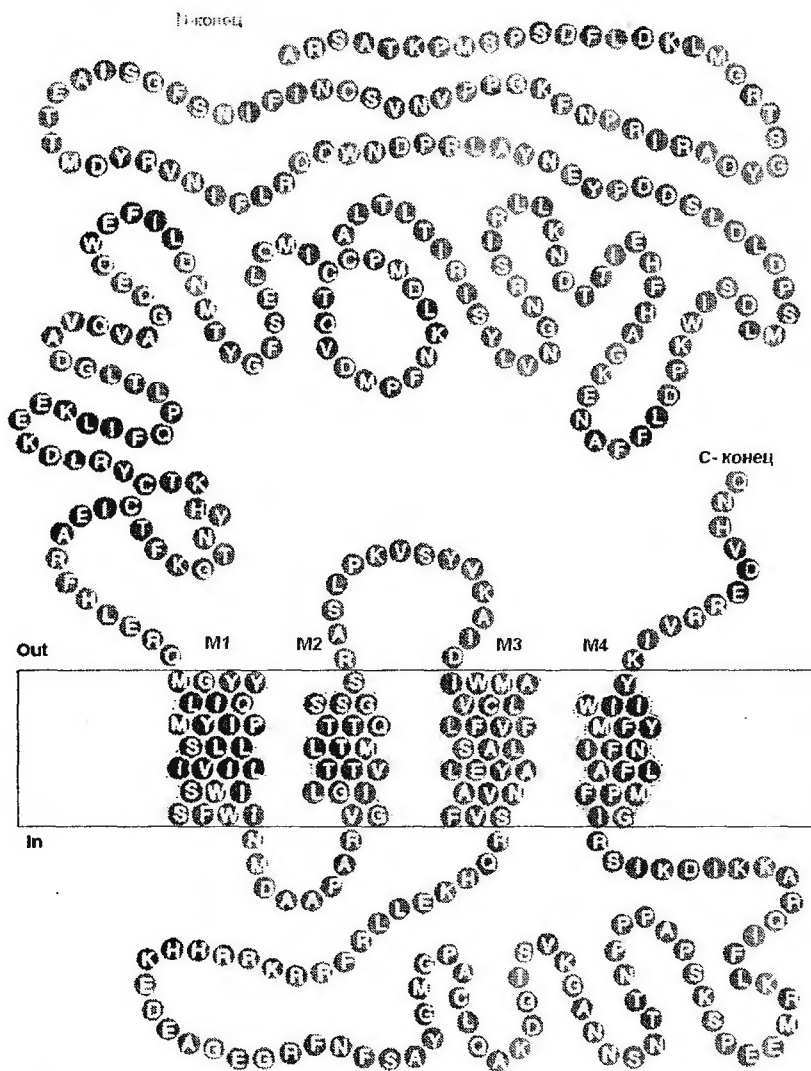


Рис. 2. Топология в мембране субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора.

M1-M4 - α -спиральные сегменты, пронизывающие мембрану.

Оказалось, что все рецепторы, связанные с G-белками, принадлежат к суперсемейству белков, имеющих 7 трансмембранных спиральных сегментов, состоящих из 19-24 аминокислот, связанных внутри- и внеклеточными участками (рис. 3).

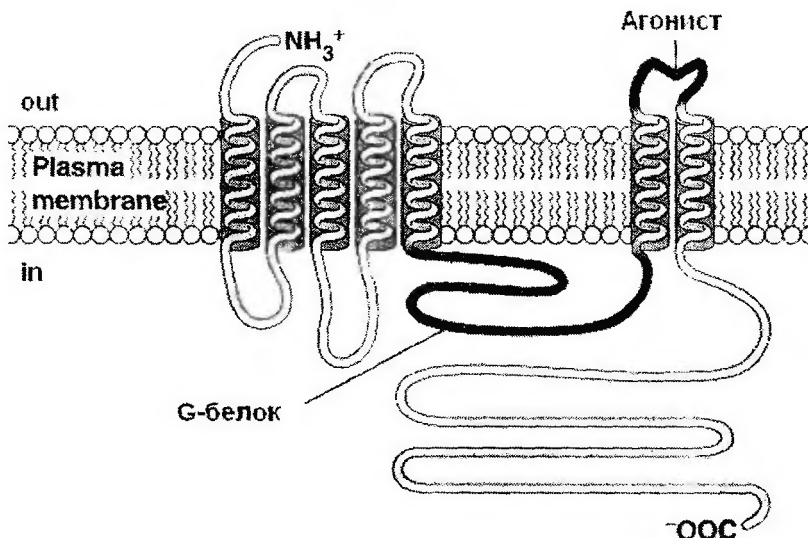


Рис. 3. Топология в мембране рецептора, связанного с G-белками.

Рецептор имеет 7 трансмембранных α -спиральных сегментов. N-конец полипептидной цепи расположен в наружной среде, С-конец - в цитозоле. Показаны фрагменты рецептора, участвующие в связывании агониста и G-белков.

Молекулярная масса рецепторов примерно одинакова – 40-50 кДа (350-500 аминокислотных остатков), N-конец расположен на наружной, а С-конец на внутренней стороне мембраны. Длина N- и С-концов, а также длина внутри- и внеклеточных участков варьирует у различных рецепторов. Третий внутриклеточный фрагмент и С-конец наиболее переменчивы. Наиболее консервативными являются конец 1-го внутриклеточного участка и начало трансмембранного сегмента 2. Полагают, что эта область может взаимодействовать с общим элементом

G-белков, таким как β и/или γ -субъединицы. Общей чертой всех рецепторов является также наличие одного или более участков N-связанного гликозилирования в области N-конца и потенциальных участков фосфорилирования на цитоплазматических фрагментах. Участки фосфорилирования включают несколько остатков серина и треонина в области третьего внутриклеточного фрагмента и C-конца. Трансмембранные сегменты содержат много остатков пролина и глицина. Эти аминокислотные остатки могут образовывать кинки в α -спиралях, участвующие в образовании лиганд-связывающих карманов, а также играть роль в передаче на цитоплазматическую поверхность рецептора конформационных изменений, сопровождающих связывание лиганда. Связывание лиганда также имеет общие черты у разных рецепторов. При этом консервативные заряженные аминокислотные остатки в трансмембранных сегментах служат, по-видимому, противоионами для положительно заряженного ретиналя, ацетилхолина или адреналина, связывающихся с соответствующими рецепторами. Так, в молекуле родопсина ретиналь взаимодействует с опсином с области лизина на 7-м трансмембранном сегменте. Напротив, для связывания катехоламина с β -адренорецептором необходима аспарагиновая кислота во 2-м трансмембранном сегменте (см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992б).

Модификации структуры рецепторов способствуют выяснению их фрагментов, участвующих в узнавании агониста и G-белка. На основании такого подхода показано, что в связывании с G-белком участвует третий цитоплазматический участок и часть C-конца, причем положительно заряженные остатки играют, по-видимому, ведущую роль (см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992б; Hancock, 1997).

К числу наиболее изученных рецепторов, связанных с G-белками, можно отнести адренергические рецепторы. Установлено, что взаимодействие катехоламинов (адреналина и норадреналина) с β -адренорецепторами (β_1 - и β_2 -типа) приводит к активации G_s -белка, α -субъединица которого активирует аденилатциклазу. α_2 -адренорецепторы, активируя G_i -белок, ингибируют аденилатциклазу. В то же время α_1 -адренорецепторы при посредничестве белка G_q активируют фосфолипазу C (Gilman, 1987).

Методами направленного мутагенеза установлены участки β_2 -адренорецептора, участвующие в связывании с G_s -белками. Так, показано, что замены или делеции аминокислот в области третьего цитоплазматического фрагмента β_2 -адренорецептора приводят к нарушению связи рецептора с G_s -белком. Эти делеции включают следующие области третьего цитоплазматического фрагмента β_2 -адренорецептора: аминокислотные остатки 239-272; 222-229; 258-270. Использование химерных α_2/β_2 -адренорецепторов также свидетельствует о решающей роли третьего цитоплазматического фрагмента β_2 -

адренорецептора в связывании с G_s -белком. Исследование химерных мускариновых холинорецепторов подтверждает вывод об участии третьего цитоплазматического фрагмента в связывании с G-белком (см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992б).

Третье большое суперсемейство мембранных рецепторов составляют рецепторы, имеющие собственную тирозинкиназную активность. Структурно-функциональные характеристики этих рецепторов будут рассмотрены далее в разделе 4.4.1.

3. Структурно-функциональная организация G-белков

Одним из важнейших этапов в приближении к пониманию механизмов гормонально-сенсорной регуляции явилось открытие семейства гуанин-нуклеотидсвязывающих белков (G-белков), передающих сигнал с мембранных рецепторов на определенные эффекторные молекулы в клетке (Neer, 1995; Sprang, 1997; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992 б).

В настоящее время установлено, что 80% всех известных гормонов, нейротрансмиттеров, нейромодуляторов, называемых «первичными мессенджерами», взаимодействуют со специфическими рецепторами, которые связаны с эффекторами через G-белки. Предполагают, что общее число различных рецепторов, связанных с G-белками, может составлять 100-150. Напротив, число эффекторов и G-белков значительно меньше, по-видимому не более 15 (Biribaumer et al., 1990a, 1990b). В настоящее время известно, что геном млекопитающих кодирует несколько типов G-белков, включающих в себя четыре G_s -белка (Nukada et al., 1986b), три G_i -белка (Nukada et al., 1986a; Suki et al., 1987), два G_o -белка (Jones, Reed, 1987; Goldsmith et al., 1988; Moriarty et al., 1990), один $G_{z/x}$ -белок (Matsuoka et al., 1988) и три класса сенсорных G-белков: G_t -белок (трансдуцин), участвующий в фоторецепции (Tanabe et al., 1985), G_{olf} -белок, участвующий в обонятельной рецепции (Jones et al., 1988) и G_{gust} -белок (гастдуцин), работающий во вкусовой рецепции (Neer, 1995). Эффекторные системы, связанные с G-белками, включают в себя аденилатциклазу, цГМФ-специфичную фосфолиэстеразу фоторецепторов, фосфолипазу C, фосфолипазу A_2 и несколько типов ионных каналов. Полагают, что возможна двойная регуляция функций эффектора со стороны G-белков: более быстрая прямая регуляция G-белком и более медленное не прямое влияние через вторичные посредники, образующиеся с участием G-белков (Yatani et al., 1988; Brown, Biribaumer, 1988; Neer, 1995).

3.1. Структура G-белков

G-белки являются гетеротримерами, состоящими из α -, β - и γ -субъединиц (Hildebrandt et al., 1984), которые при активации диссоциируют на комплекс α -ГТФ и $\beta\gamma$ -димер. Именно α -субъединицы, имеющие мол. массу 39000 – 50000 Да, связывают и гидролизуют ГТФ, определяя специфичность связывания G-белка с рецептором и эффектором и являются уникальными для каждого G-белка (Bockaert et al., 1987).

Методами молекулярного клонирования к настоящему времени выявлено 16 генов, кодирующих различные α -субъединицы G-белков позвоночных (Iyengar, Birnbaumer, 1990; Neer, 1995). Выделяют четыре основных класса α -субъединиц G-белков: α_s (четыре вида α_s , α_{sLs} , α_{off}), α_i (α_{i1} , α_{i2} , α_{i2L} , α_{i3} , α_{o1} , α_{o2} , α_{gust} , α_i , α_z), α_q (α_q , α_{i1} , α_{i4} , α_{i5} , α_{i6}) и α_{12} (α_{i2} , α_{i3}) (Neer, 1995; Hancock, 1997; Sprang, 1997).

Все α -субъединицы содержат аминокислотные последовательности, высокоомологичные последовательностям в бактериальном факторе элонгации, которые участвуют в связывании и гидролизе ГТФ. К числу таких участков относится последовательность из 18 аминокислот, неизменная во всех клонированных α -субъединицах позвоночных и служащая для их идентификации. Этот фрагмент ограничен с двух сторон лизином или аргинином. На основании данных рентгеноструктурного анализа бактериального фактора элонгации и амфипатического анализа первичной структуры α_s , α_i , α_o , α_{i-1} и α_{i-2} была установлена вторичная структура «усредненной» α -субъединицы, в которой выявлены участки связывания гуаниновых нуклеотидов, возможного взаимодействия с рецептором (С-конец) и $\beta\gamma$ -димерами (N-конец), а также места АДФ-рибозилирования при действии холерного токсина (ХТ) и коклюшного токсина (КТ) (Masters et al., 1986; Birnbaumer et al., 1990a).

α -субъединица состоит из двух доменов: 1) ГТФ-азного домена, содержащего участки связывания гуаниновых нуклеотидов, рецепторов, эффекторов, $\beta\gamma$ -димера и 2) спирального домена, участвующего, по-видимому, во взаимодействии с эффектором (Neer, 1995; Sprang, 1997) (рис. 4).

Методами очистки и молекулярного клонирования идентифицировано 5 изоформ β -субъединицы с мол. массами 35000-36000 Да (Gao et al., 1987; Neer, 1995; Sprang, 1997) и 10 изоформ γ -субъединицы с мол. массой 6000-10000 Да (Hildebrandt et al., 1984, 1985; Yatsunami et al., 1985; Sprang, 1997). В нативной форме β - и γ -субъединицы существуют или как часть голо-G-белков в связи друг с другом и с α -субъединицей, или в виде смеси свободных $\beta\gamma$ -димеров (Mattera et al., 1986).

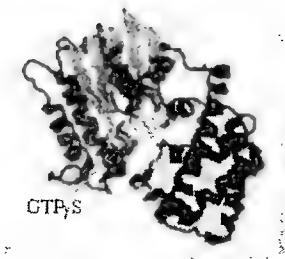


Рис. 4. Структура α -субъединицы G_i -белка.

Показан комплекс α -субъединицы с негидролизуемым аналогом ГТФ ГТФ γ S ($GTP\gamma S$).

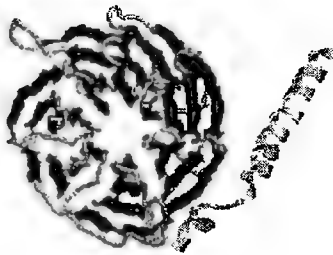


Рис. 5. Структура β -субъединицы G_i -белка.

На N-конце полипептидной цепи расположена амфипатическая α -спираль, за которой следуют 7 повторяющихся единиц из 43 аминокислот (так называемые WD повторы). Этот C-концевой домен из 300 аминокислот носит название β -пропеллера (вид спереди).

β -субъединица содержит два типа структур: на N-конце расположена амфипатическая α -спираль, за которой следуют 7 повторяющихся единиц из 43 аминокислот (так называемые WD повторы). Этот C-концевой домен из 300 аминокислот носит название β -пропеллера. Семь WD повторов образуют лопасти пропеллера (Neer, 1995; Sprang, 1997) (рис. 5).

γ -субъединица состоит из двух спиральных сегментов, соединенных петлей. N-концевая спираль γ -субъединицы взаимодействует с N-терминальной спиралью β -субъединицы. Вторая спираль γ -субъединицы

расположена около 5-го и 6-го WD повтора (около 5-ой и 6-ой лопасти пропеллера) β -субъединицы, а C-терминальная петля γ -субъединицы локализована в гидрофобном кармане на поверхности β -субъединицы (Neer, 1995; Sprang, 1997). α -субъединица может взаимодействовать как с β -, так и с γ -субъединицей. Так, 30 аминокислот на N-конце α -субъединицы взаимодействуют с 1-ой лопастью пропеллера (первым и вторым WD повтором) β -субъединицы (Neer, 1995; Sprang, 1997).

3.2. Регуляция активности G-белков

Регуляторный цикл G-белка начинается в тот момент, когда связанный с лигандом рецептор катализирует два процесса: 1) освобождение связанного с G-белком ГДФ; 2) связывание ГТФ с последующей активацией G-белка (Brown, Birnbaumer, 1988; Neer, Clapham, 1988; Neer, 1995) (рис. 6). Процесс активации включает в себя также два этапа: 1) конформационное изменение G-белка, которое превращает связывание ГТФ из легкообратимого в прочное, практически необратимое; 2) диссоциацию субъединиц G-белка, что приводит к образованию специфического активированного комплекса α -ГТФ и $\beta\gamma$ -димеров. Именно активированные α -субъединицы (α -ГТФ) регулируют функции эффекторов (Birnbaumer et al., 1990a, 1990b).

Деактивация комплексов α -ГТФ происходит при гидролизе ГТФ до ГДФ, что является неотъемлемым свойством всех α -субъединиц (Hildebrandt et al., 1985). Гидролиз ГТФ превращает активированные α -ГТФ комплексы (с низким сродством к $\beta\gamma$ -димерам) в неактивные α -ГДФ комплексы (с высоким сродством к $\beta\gamma$ -димерам). Это приводит к ассоциации α -ГДФ с $\beta\gamma$ -димером с образованием гетеротримера G-белка. Таким образом, G-белки представляют собой систему с регуляцией по принципу отрицательной обратной связи (рис. 6). При последующей активации рецепторов и связывании ГТФ α -субъединицей цикл повторяется снова (Sternweis, Pang, 1990; Neer, 1995; Sprang, 1997).

Важным свойством G-белков, позволяющим эффективно изучать их участие в тех или иных внутриклеточных процессах, является возможность их необратимой активации (или инактивации), минуя стадию стимуляции рецептора агонистом. Необратимую активацию G-белков вызывают негидролизуемые аналоги ГТФ: ГТФ γ s (гуанозин-5'-O-(3-тиофосфат)) и ГМФ-P(NH)P (5'-гуанилилимидодифосфат) (Gilman, 1987). К необратимой инактивации G-белков приводит их связывание с негидролизуемым аналогом ГДФ - ГДФ β S (гуанозин -5'-O-(2-тиодифосфат) (Birnbaumer et al., 1990a, 1990b).

Чрезвычайно полезным для изучения роли G-белков в активации клеток оказалось применение таких природных бактериальных ядов, как ХТ и КТ,

которые АДФ-рибозилируют G-белки (Birnbaumer et al., 1989, 1990a). ХТ приводит к постоянной активации аденилатциклазы, действуя на α_s -субъединицу и подавляя ее ГТФазную активность. КТ, наоборот, ингибирует активность α_i -субъединицы.

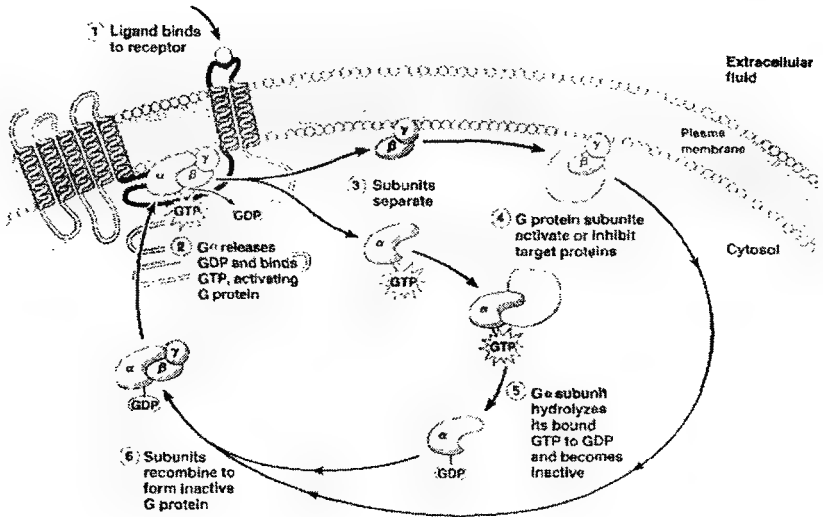


Рис. 6. Регуляторный цикл гетеротримерного G-белка.

Активированный лигандом рецептор (1) катализирует освобождение связанного с α -субъединицей G-белка ГДФ (GDP) и связывание ГТФ (GTP), что приводит к активации G-белка (2). G-белок диссоциирует на α -ГТФ и $\beta\gamma$ -димер (3), которые активируют или ингибируют различные белки-мишени в клетке (4). Деактивация комплекса α -ГТФ происходит при гидролизе ГТФ до ГДФ (5). Гидролиз ГТФ превращает активированные α -ГТФ комплексы в неактивные α -ГДФ комплексы. α -ГДФ связывается с $\beta\gamma$ -димером с образованием неактивного гетеротримерного G-белка (6).

α , β , γ - субъединицы G-белка.

Удобным инструментом для изучения G-белков является комплекс AlF_4^- . Показано, что он необратимо активирует G-белки типов G_s , G_i и G_t (Cockcroft, 1987; Gilman, 1987). Считается, что AlF_4^- имеет структуру, сходную с фосфатной группой, и может взаимодействовать с ГДФ, связанным с α -субъединицей G-белков. Таким образом, AlF_4^- активирует

α -субъединицу G-белка, связываясь с ГДФ и имитируя присоединение третьего фосфата (Bigay et al., 1987).

Установлено также, что G-белки являются субстратом для модификации такими эндогенными энзимами, как протеинкиназа C (Rupe et al., 1989). Кроме того, G-белки подвержены прямой рецептор-независимой активации катионными амфифильными нейропептидами (субстанция P) и пептидами из яда насекомых (Mousli et al., 1990).

3.3. Связь G-белков с мембраной

В первичной структуре всех субъединиц G-белков отсутствуют гидрофобные, пронизывающие мембрану домены, и до недавнего времени оставались неясными молекулярные механизмы связи G-белков с мембраной. В то же время было понятно, что связь G-белков с мембраной является необходимой для обеспечения соответствующей ориентации компонентов цепи передачи сигнала. В последние годы было установлено, что для ассоциации G-белков с мембраной важно ацилирование G-белков жирнокислотными радикалами, что, как известно, сильно увеличивает гидрофобность белков. Выявлены два типа липидных модификаций субъединиц G-белков - миристоилирование и изопренилирование белковой цепи (Spiegel et al., 1991).

Большинство α -субъединиц ведут себя как интегральные мембранные белки: они не выделяются из мембраны при действии буферов с разной ионной силой (Buss et al., 1987), но освобождаются при воздействии детергентов или высоких pH (Audigier et al., 1990). Парадоксально, но очищенные α -субъединицы ведут себя как гидрофильные белки, так как не могут связываться с искусственными фосфолипидными пузырьками в отсутствие $\beta\gamma$ -комплекса (Sternweis, 1986). Это послужило основой для предположения о том, что $\beta\gamma$ -комплекс может служить якорем для α -субъединицы в мембране. Если это так, то можно было бы ожидать, что активация G-белка и диссоциация α -субъединицы от $\beta\gamma$ -комплекса будут приводить к освобождению α -субъединицы из мембраны. Однако было показано, что активация мембранно-связанных G-белков даже при действии негидролизуемого аналога ГТФ (ГТФys) приводит к очень медленному освобождению α -субъединиц или освобождению не наблюдается совсем (Milligan et al., 1988). Очевидно, что α -субъединицы могут связываться с мембраной независимо от $\beta\gamma$ -комплекса. Воздействие трипсина на обработанные ГТФys мембраны вызывает освобождение растворимых α -субъединиц, у которых отсутствует N-концевой фрагмент (1-2 кДа), что свидетельствует о том, что α -субъединицы связаны с мембраной своим N-концевым участком (Eide et al., 1987).

4. Структурно-функциональная организация сигнальных систем в клетках

4.1. Аденилатциклазный путь передачи информации

Во всех клетках животных и растений имеются два основных пути передачи сигнала, различающихся по вторичным посредникам - аденилатциклазный и фосфоинозитидный. Эти пути передачи сигнала имеют много общего. В обоих случаях информацию от первого звена рецептора получают и передают через мембрану в цитоплазму так называемые G-белки, активирующиеся при связывании гуанозинтрифосфата (ГТФ). G-белки активируют "усилительный" фермент на внутренней стороне мембраны, который способствует превращению молекул вещества-предшественника в молекулы вторичного посредника. Конечные стадии разных способов передачи сигналов сходны: вторичные мессенджеры вызывают изменение структуры клеточных белков.

Концепция сигнализации с участием вторичных мессенджеров появилась с открытием Сазерлендом роли циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в процессе гликогенолиза (Sutherland, Rall, 1958; Sutherland, 1972). В дальнейшем была показана важная роль цАМФ в регуляции различных клеточных процессов, таких как пролиферация, секреция, сокращение, мембранный транспорт, нейротрансдукция, малигнизация клеток и т.д. Было обнаружено, что влияние на внутриклеточный уровень цАМФ характерно для целого ряда гормонов и медиаторов.

В аденилатциклазном пути передачи информации внешний сигнал после взаимодействия со стимулирующим рецептором через G-белок типа G_s активирует "усилительный" фермент аденилатциклазу (АЦ) (рис. 7). АЦ катализирует превращение аденозинтрифосфата (АТФ) в цАМФ (рис. 8). Субстратом для АЦ является Mg^{2+} -АТФ или Mn^{2+} -АТФ (Liu et al., 1997). Свободная АТФ является ингибитором активности АЦ. Другие агонисты, связываясь с ингибирующими рецепторами, активируют G_i -белки, которые ингибируют АЦ.

В последнее время появились данные о том, что аденилатциклазная система может активироваться не только при стимуляции рецепторов, связанных с G-белками, но и при активации рецепторов, имеющих собственную тирозинкиназную активность (рецепторы инсулина и эпидермального фактора роста) (Плеснева и др., 1996). Так, в цитоплазматическом домене β -субъединицы инсулинового рецептора выявлены два участка связывания с G_s и G_i белками (Шпаков, 1996).

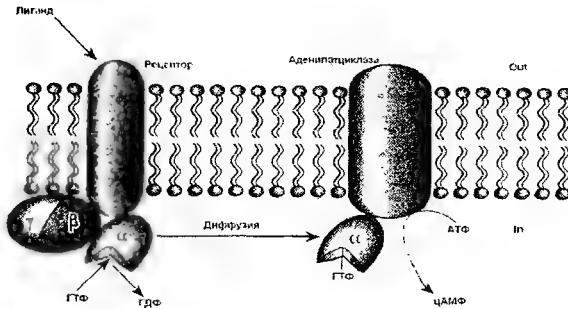


Рис. 7. Схема аденилатциклазного пути передачи сигнала.

Активация рецептора лигандом приводит к активации гетеротримерного G-белка, который диссоциирует на α -ГТФ и $\beta\gamma$ -димер. α -ГТФ активирует аденилатциклазу, катализирующую образование цАМФ из АТФ (по Hancock, 1997).

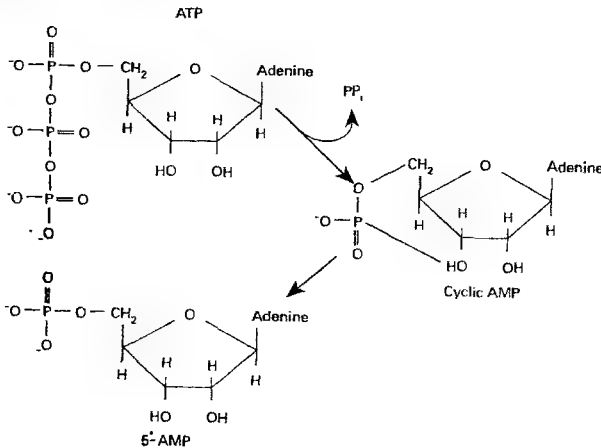


Рис. 8. Образование и гидролиз цАМФ.

Cyclic AMP - цАМФ. Фосфодиэстераза катализирует гидролиз цАМФ до 5'-АМФ (по Hancock, 1997).

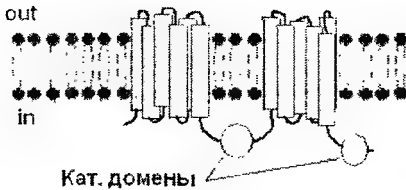


Рис. 9. Топология в мембране аденилатциклазы.

Показаны 12 трансмембранных α -спиральных сегментов и 2 цитоплазматических каталитических домена.

Конечные стадии передачи сигнала с помощью цАМФ осуществляются с участием цАМФ-зависимых протеинкиназ (протеинкиназ А), которые фосфорилируют определенные белки-мишени по остаткам серина или треонина.

Уменьшение концентрации цАМФ происходит с помощью фосфодиэстеразы, катализирующей расщепление цАМФ с образованием АМФ. В экспериментальных работах в качестве ингибиторов фосфодиэстеразы обычно используют теofilлин, 3-изобутил-1-метилксантин и кофеин; имидазол стимулирует активность этого фермента (Авдонин, Ткачук, 1994; Petersen, Berridge, 1995).

4.1.1. Структура и регуляция аденилатциклазы

АЦ, ключевой фермент аденилатциклазного пути передачи сигнала, обнаружен во всех типах клеток. В настоящее время клонировано 8 изоформ (типы I-VIII) АЦ из разных тканей (Krupinski et al., 1989; Cooper et al., 1995). Показано, что АЦ является интегральным мембранным белком (1080-1248 аминокислот, мол. масса 120 кДа), полипептидная цепь которого имеет 12 гидрофобных трансмембранных сегментов, образованных 20-22 аминокислотами каждый. Трансмембранные сегменты объединены в два кластера по 6 в каждом, а между кластерами со стороны цитоплазмы расположены два длинных фрагмента полипептидной цепи с мол. массой 43 кДа (рис. 9). Во внеклеточную область экспонированы сравнительно небольшие фрагменты белка, имеющие участки N-гликозилирования. По своей структуре АЦ удивительно напоминает Cl-канал регулятора трансмембранной проводимости при цистефиброзе (CFTR) и гликопротеин Р - белок, обеспечивающий резистентность ко многим лекарствам, как

предполагают, за счет своей способности выводить их из клетки (Gottesman, Pastan, 1988; Riordan et al., 1989).

Трансмембранные сегменты не отличаются высоким консерватизмом у разных изоформ АЦ, а также не имеют гомологии с высококонсервативными трансмембранными сегментами ионных каналов (Catterall, 1995). Два цитоплазматических фрагмента АЦ включают два АТФ-связывающих домена, которые гомологичны друг другу (Krupinski et al., 1989). Участок связывания Ca^{2+} /кальмодулина с АЦ I типа также расположен в первом цитоплазматическом фрагменте.

Специфическое активирующее действие на АЦ оказывает форсколин, получаемый из травянистого растения *Coleus forskohlii*. В связи с этим, он широко используется в экспериментах как инструмент для выяснения роли адезилатциклазной системы в реализации той или иной биологической функции. Форсколин связывается, по-видимому, с тем же участком фермента, с которым связывается АТФ (Liu et al., 1997). Показано, что три кольца в структуре форсколина и аденозина имеют сходные комбинации групп, образующих гидрофобные и водородные связи.

Считается общепринятым, что активация АЦ происходит в результате ее прямого взаимодействия с α_s -субъединицей G_s -белка (Northup et al., 1983b). Ингибирование АЦ осуществляется при прямом взаимодействии АЦ с α_i -субъединицей G_i -белка (Katada et al., 1984; Katada et al., 1986) или при взаимодействии с $\beta\gamma$ -димерами различных G-белков (Northup et al., 1983a; Neer et al., 1987). Установлено, что для связывания с $\beta\gamma$ -димерами G-белков важен фрагмент из 5 аминокислот (Gln-X-X-Glu-Arg) АЦ типа II (Chen et al., 1995).

В последнее время показана сложная множественная регуляция всех клонированных изоформ АЦ. Обнаружено, что один подтип АЦ активируется α_s -субъединицами G_s -белков и не зависит от $\beta\gamma$ -димеров. Другой подтип АЦ активируется α_s -субъединицами и синергично активируется далее $\beta\gamma$ -субъединицами. Для третьего подтипа АЦ характерны активация α_s -субъединицами и ингибирование при действии $\beta\gamma$ -димеров (Tang, Gilman, 1991).

Установлено, что все восемь клонированных изоформ АЦ регулируются одной из ветвей фосфоинозитидного пути. Аденилатциклазы I, III и VIII типа, экспрессированные в клетках гиппокампа и мозжечка, стимулируются α_s -субъединицами G_s -белков и внутриклеточными ионами Ca^{2+} и ингибируются $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков. Протеинкиназа C не оказывает стимулирующего действия на эти изоформы АЦ. Аденилатциклазы II, IV и VII типов, идентифицированные в определенных отделах мозжечка, стимулируются α_s -субъединицами, протеинкиназой C и $\beta\gamma$ -димерами. В хвостатом ядре мозга и миоцитах

сердца идентифицированы аденилатциклазы V и VI типов, которые активируются α_s -субъединицами и ингибируются при увеличении $[Ca^{2+}]_i$. Протеинкиназа C и $\beta\gamma$ -димеры не оказывают влияния на эти изоформы АЦ (Cooper et al., 1995).

Установлено, что стимуляция АЦ I, III и VIII типов Ca^{2+} опосредована кальмодулином, который может быть удален и добавлен вновь для восстановления чувствительности к Ca^{2+} (Cooper et al., 1995).

Функциональные и ультраструктурные исследования показали, что АЦ локализована рядом с каналами входа Ca^{2+} в клетки. Так, в клетках гиппокампа млекопитающих АЦ расположена рядом с NMDA-рецепторами. Ионы Ca^{2+} , входящие в клетку по каналам NMDA-рецепторов, активируют Ca^{2+} /кальмодулин-стимулируемые АЦ I или VIII типов, что приводит к увеличению концентрации цАМФ. цАМФ диффундирует на очень малые расстояния и активирует протеинкиназу A, которая закреплена в определенных участках клетки с помощью специфических закрепляющих белков AKAPs (cAMP-dependent protein kinase anchoring proteins) (Cooper et al., 1995).

В возбудимых клетках (миоцитах сердца) Ca^{2+} , входящий по потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам L типа, ингибирует АЦ V и VI типов (Cooper et al., 1995).

Для невозбудимых клеток показано, что АЦ колокализована с каналами депо-зависимого входа Ca^{2+} . Обнаружено, что только Ca^{2+} , входящий в клетку по депо-зависимым Ca^{2+} -каналам, а не Ca^{2+} , освобожденный из внутриклеточных депо, регулирует активность АЦ. Так, в клетках глиомы линии C6-2B Ca^{2+} -ингибируемая АЦ типа VI функционально и пространственно колокализована с депо-зависимыми каналами входа Ca^{2+} (Chiono et al., 1995; Fagan et al., 1998). Показано, что только депо-зависимый вход Ca^{2+} , вызванный тремя независимыми методами (приложение тапсигаргина, иономицина или УТФ), а не мобилизация Ca^{2+} из депо, ингибирует синтез цАМФ в этих клетках. Тесная пространственная взаимосвязь между АЦ и каналами депо-зависимого входа Ca^{2+} подтверждается также тем, что разрушение цитоскелета не влияет на регуляцию АЦ внутриклеточным Ca^{2+} (Fagan et al., 1998).

Тесная взаимосвязь с каналами депо-зависимого входа Ca^{2+} показана также для Ca^{2+} -стимулируемых изоформ АЦ. Обнаружено, что Ca^{2+} -стимулируемые АЦ I и VIII типов, экспрессированные в клетках линии НЕК 293, регулируются исключительно депо-зависимым входом Ca^{2+} , а не Ca^{2+} , освобожденным из депо (Fagan et al., 1996).

Вышеизложенное свидетельствует о том, что жесткая локализация АЦ в мембране дает ей возможность быстро и избирательно реагировать на вход Ca^{2+} в клетку. Регуляция активности АЦ внутриклеточным Ca^{2+} .

позволяет клетке интегрировать активность двух основных вторичных мессенджеров, цАМФ и Ca^{2+} .

В последнее время появились данные о том, что концентрация цАМФ может регулироваться внеклеточным Ca^{2+} в физиологических концентрациях. Так, показано, что Ca^{2+} -ингибируемая АЦ VI типа функционально колокализована в клетках почки крысы с рецептором, чувствительным к внеклеточной концентрации Ca^{2+} (Ferreira et al., 1998).

4.1.2. Структура и регуляция протеинкиназы А

Второй ключевой фермент аденилатциклазного пути передачи информации, протеинкиназа А (ПКА), идентифицирована во всех тканях млекопитающих. В отсутствие цАМФ, ПКА представляет собой неактивный тетрамер, состоящий из двух регуляторных (R) и двух каталитических (C) субъединиц и имеет четвертичную структуру R_2C_2 (Francis, Corbin, 1994). Показано, однако, что *in vitro* ПКА может функционировать как димер, состоящий из одной R и одной C субъединиц. При связывании двух молекул цАМФ с одной R субъединицей, сродство R и C субъединиц уменьшается в 10000-100000 раз и тетрамерная ПКА диссоциирует на димер из двух R субъединиц и две мономерные C субъединицы, фосфорилирующие различные белковые субстраты.

Регуляторная R субъединица (мол. масса 43-45 кДа) имеет следующие функциональные домены, начиная с N-конца молекулы: домен, участвующий в димеризации субъединиц; домен, содержащий участки аутофосфорилирования; два домена, связывающих цАМФ с низким и высоким сродством, соответственно; C-терминальный домен. У млекопитающих идентифицированы две основные изоформы R субъединицы – RI и RII (Francis, Corbin, 1994).

Каталитическая C субъединица ПКА представляет собой глобулярный белок с мол. массой 40 кДа (350 аминокислот), миристоилированный на N-конце. Далее расположены: домен, связывающий Mg^{2+} /АТФ; домен, взаимодействующий с белковыми субстратами, и обеспечивающий каталитическую функцию; C-терминальный домен.

Активированная C-субъединица в присутствии Mg^{2+} /АТФ катализирует перенос γ -фосфата с АТФ на различные белковые субстраты, содержащие последовательность аминокислот –Arg-Arg-X-Ser/Thr-X- (Kennely, Krebs, 1991; Francis, Corbin, 1994). Показано, что для каталитической активности C-субъединицы важны 3 аминокислоты (Asp-166, Lys-168 и Asn-171), которые являются консервативными во всех протеинкиназах, фосфорилирующих белки по остаткам серина или

треонина. У млекопитающих идентифицированы 3 изоформы С субъединицы: α , β и γ (Francis, Corbin, 1994).

Фосфорилирование белков является одним из основных способов передачи сигналов, контролирующих различные клеточные процессы. В соответствии с этим, активность протеинкиназ и фосфатаз должна жестко регулироваться. Один из уровней регуляции заключается в определенной субклеточной локализации киназ и фосфатаз путем взаимодействия их с определенными «закоривающими белками», что способствует быстрой и избирательной модуляции специфических мишеней в определенных микродоменах клетки в ответ на растворимые вторичные мессенджеры (Dell 'Acqua, Scott, 1997). Так, обнаружено, что во многих тканях значительная часть ПКА, главным образом протеинкиназы типа II, расположена в определенных доменах клетки благодаря взаимодействию регуляторных RII субъединиц с соответствующими «закоривающими белками», которые были названы AKAPs (Coghlan et al., 1995; Dell 'Acqua, Scott, 1997).

Каждый закоривающий белок содержит два типа связывающих участков: консервативный «закоривающий фрагмент», который связывает R субъединицу ПКА, и домен, который определяет субклеточную локализацию комплекса ПКА-AKAP путем взаимодействия со структурными белками, мембранами или клеточными органеллами. Показано, что для связывания с AKAPs важны остатки изолейцина в положении 3 и 5 RII субъединицы ПКА. Иммунохимическими методами идентифицированы AKAPs, связанные с центросомами (AKAP350), актиновыми филаментами (AKAP78 или эзрин; AKAP250), эндоплазматическим ретикулом (AKAP100), аппаратом Гольджи (AKAP85), митохондриями (AKAP84), плазматической мембраной (AKAP15) (Dell 'Acqua, Scott, 1997).

Важность закоривания ПКА с помощью AKAPs установлена для потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа из скелетных мышц, активность которых увеличивается при фосфорилировании ПКА (Gray et al., 1997; Catterall, 2000). С помощью биохимических и иммунологических методов показано, что Ca^{2+} -каналы L-типа выделяются из скелетных мышц вместе с ПКА и закоривающим белком AKAP15. Это свидетельствует о том, что AKAP15 обеспечивает закоривание ПКА около Ca^{2+} -канала.

Ca^{2+} -каналы L-типа из клеток гладких мышц сосудов также фосфорилируются ПКА, закоренной с помощью специфического белка AKAP (Zhong et al., 1999). Стимулирующее действие ПКА на Ca^{2+} -каналы устраняется пептидом Ht 31, ингибирующим связывание ПКА с AKAP.

$\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренергические рецепторы в клетках сердца модулируют активность Ca^{2+} -каналов L-типа, активируя ПКА, закоренную с помощью белка AKAP15 (Kamp, Hell, 2000).

Для потенциал-зависимых Na^+ -каналов из клеток мозга также обнаружено, что AKAP15 закрывает ПКА около Na^+ -каналов (Tibbs et al., 1998).

В последнее время обнаружены мультивалентные AKAPs, которые одновременно связывают не только ПКА, но и другие ферменты. Предполагают, что эти AKAPs служат участками сборки сигнальных комплексов, состоящих из нескольких киназ и фосфатаз. Так, в нейронах ПКА локализована в области постсинаптических уплотнений благодаря взаимодействию ее регуляторной субъединицы с AKAP79. Показано, что AKAP79 связывает также фосфатазу 2B (кальцийнейрин) и протеинкиназу C (Coghlan et al., 1995; Dell'Acqua, Scott, 1997). Таким образом, AKAP79 координирует локализацию трех сигнальных ферментов в области постсинаптических уплотнений. Потенциальными мишенями для этого сигнального комплекса могут быть ионотропные рецепторы или Ca^{2+} -каналы, которые могут модулироваться ПКА, а также NMDA рецепторы, которые активируются протеинкиназами A или C и ингибируются фосфатазой 2B.

В мегакариоцитах человека идентифицирован AKAP250 или гравин, связанный с актиновыми филаментами. Обнаружено, что AKAP250 содержит связывающие участки для ПКА и протеинкиназы C (Dell'Acqua, Scott, 1997).

Можно предположить, что сигнальные комплексы, включающие AKAPs, определяют специфичность действия цАМФ путем компартментализации ПКА не только с фосфатазами, но также и с фосфодиэстеразами, отвечающими за выключение сигнала.

Таким образом, вышеизложенное свидетельствует о высокой степени пространственной организации компонентов аденилатциклязной системы.

4.2. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала

Роль мембранных фосфоинозитидов в передаче сигнала изложена в многочисленных обзорах (Berridge, 1984, 1987, 1993; Berridge, Irvine, 1984, 1989; Крутецкая, Лебедев, 1992а; Лебедев, Крутецкая, 1994; Крутецкая, Лебедев, 2000а).

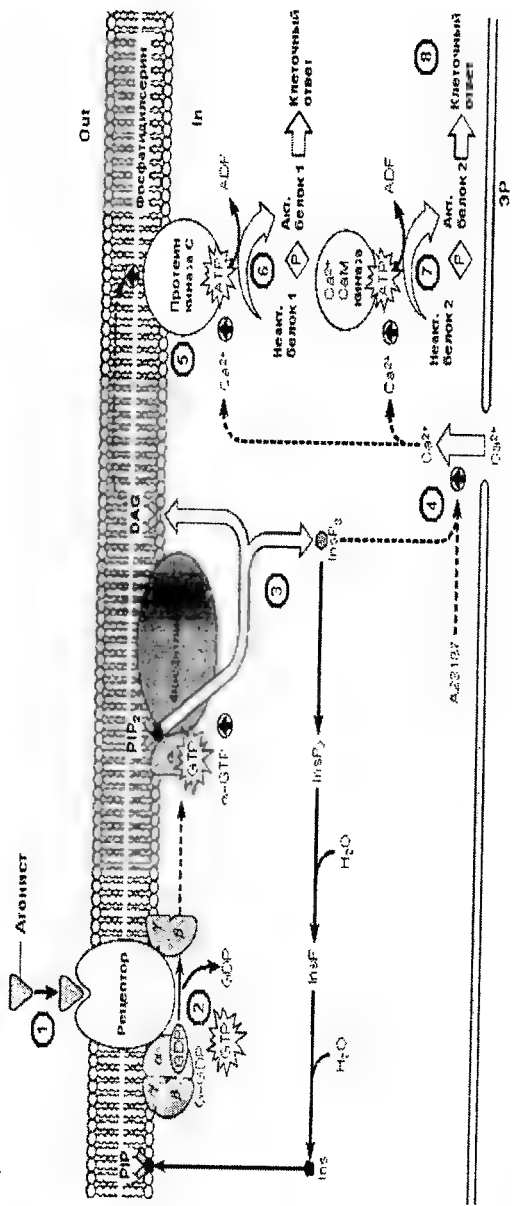


Рис. 10. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала в клетке.

α , β , γ - субъединицы G-белка. Связывание агониста с рецептором (1) приводит к активации рецептора и последующей активации гетеротримерного G-белка (2). G-белок катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP_2) с образованием диацилглицерина (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) (3). IP_3 вызывает мобилизацию Ca^{2+} из депо (4). Сходное действие имеет Ca^{2+} -ионофор A23187. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводит к активации Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназы ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ киназы), которая фосфорилирует белки-мишени (7) и вызывает клеточный ответ (8). DAG и увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызывают активацию протеинкиназы C (5), которая фосфорилирует белки-мишени по остаткам серина и треонина (6).

Внешний сигнал после взаимодействия с рецептором через G-белок активирует усилительный фермент фосфолипазу С (ФЛС) (рис. 10). ФЛС расщепляет мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) на два соединения, служащие внутриклеточными мессенджерами: водорастворимый инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP_3) и липидорастворимый диацилглицерин (DAG) (Berridge, 1993) (рис. 11).

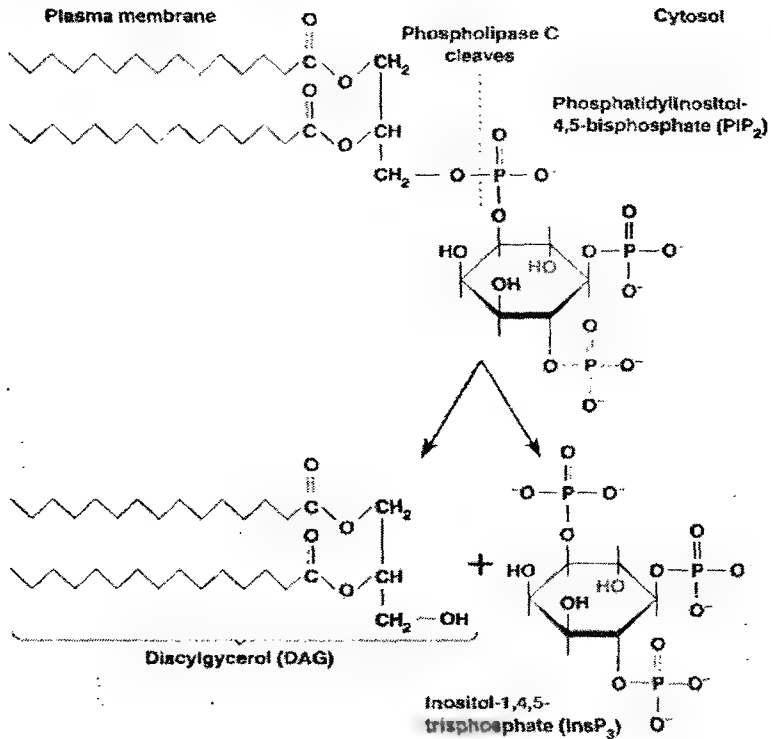


Рис. 11. Образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина.

Фосфолипаза С (phospholipase C) катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP_2) с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерина (DAG).

Клеточные рецепторы, ответственные за мобилизацию Ca^{2+} , взаимодействуют с особым G-белком (G_q), активирующим ФЛС и, следовательно, образование IP_3 и DAG. G_q действует по тому же принципу, что и G-белки, регулирующие активность АЦ (Neer, 1995). Гидрофильный IP_3 диффундирует в цитоплазму и вызывает освобождение кальция из внутриклеточных депо (эндоплазматический ретикулум, митохондрии). Ионы Ca^{2+} образуют комплекс с Ca^{2+} -связывающим белком кальмодулином. Этот комплекс активирует протеинкиназу, катализирующую фосфорилирование неактивного белка, что приводит к активации последнего и возникновению клеточного ответа (Berridge, 1984, 1987, 1993; Berridge, Irvine, 1984, 1989; Крутецкая, Лебедев, 1992a).

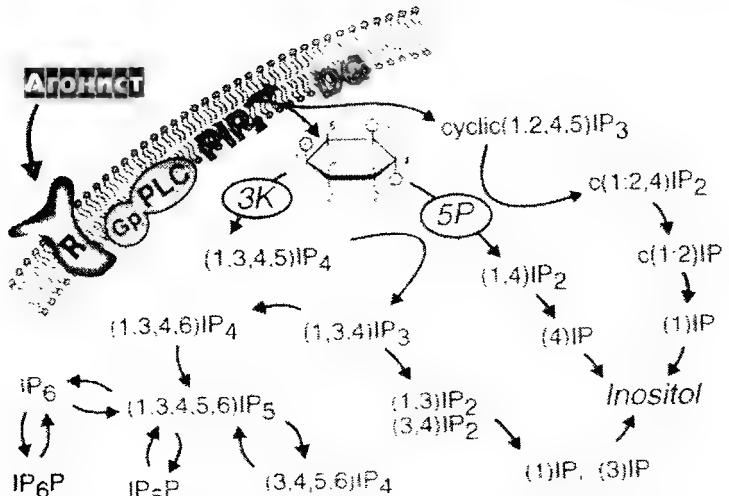
Оставшийся в мембране DAG активирует протеинкиназу C. Для этого необходимы кислый фосфолипид фосфатидилсерин (ФС) и Ca^{2+} . Протеинкиназа C катализирует присоединение фосфата к остаткам серина или треонина неактивного белка, белок активируется, запускается цепь внутриклеточных реакций, и в конечном итоге возникает ответная реакция клетки (Nishizuka, 1984, 1988, 1995).

DAG фосфорилируется диацилглицеринкиназой с образованием фосфатидной кислоты (для осуществления этой реакции необходим АТФ) (Berridge, Irvine, 1984). Возможно, фосфатидная кислота выполняет функцию кальциевого ионофора и транспортирует Ca^{2+} через плазматическую мембрану, модифицируя структуру липидного бислоя таким образом, что образуются участки с небислошной упаковкой молекул. При этом на границе бислоя и монослоя образуются дефекты, «каналы» для ионов Ca^{2+} (Eible, Blume, 1979). DAG содержит, как правило, во втором положении остаток арахидоновой кислоты. Образующаяся под действием диацилглицеринлипазы, свободная арахидоновая кислота представляет собой исходный материал для синтеза физиологически активных соединений – простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов. Они, в свою очередь, способны эффективно модулировать разнообразные реакции в клетке (см. ниже).

$(1,4,5)\text{IP}_3$ дефосфорилируется под действием 5-фосфатазы до инозитол-1,4-дифосфата, $(1,4) \text{IP}_2$, или наоборот, может фосфорилироваться до инозитол-1,3,4,5-тетракифосфата, IP_4 , при действии 3-киназы (Berridge, Irvine, 1984, 1989) (рис. 12).

Конечная стадия в цикле инозитолфосфатов – превращение инозитолмонофосфата (IP) в свободный инозитол, которое катализируется ферментом инозитол-1-монофосфатазой. Активность этого фермента блокируется ионами Li^+ . Именно этим объясняется эффективное лечение ионами Li^+ маниакально-депрессивных психозов и некоторых других заболеваний нервной системы. Блокада литием инозитол-1-монофосфатазы замедляет синтез инозитола в организме и ослабляет протекающие в нейронах процессы, зависящие от метаболизма

фосфоинозитидов. Эффект Li^+ специфичен; Li^+ не действует на нормально функционирующие рецепторы, а “находит” и тормозит гиперактивные



рецепторы (Berridge, 1984, 1987, 1993; Berridge, Irvine, 1984, 1989).

Рис. 12. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала и метаболизм инозитолфосфата в клетках.

Активация агонистом мембранного рецептора (R) приводит к активации гетеротримерного G-белка (G_p) и последующей стимуляции полифосфоинозитид-специфической фосфолипазы C (PLC), которая катализирует гидролиз фосфатидилинозитол 4,5-дифосфата (PIP_2) с образованием двух вторичных мессенджеров: инозитол-1,4,5-трифосфата ($(1,4,5)\text{IP}_3$), вызывающего мобилизацию Ca^{2+} из депо, и диацилглицерола (DG), активирующего протеинкиназу C. Минорным продуктом гидролиза PIP_2 является циклическое производное $(1,4,5)\text{IP}_3$, циклический $(1:2,4,5)\text{IP}_3$. $(1,4,5)\text{IP}_3$ дефосфорилируется под действием 5-фосфатазы (5P) до инозитол-1,4-дифосфата $(1,4)\text{IP}_2$, или, наоборот, может фосфорилироваться до инозитол-1,3,4,5-тетракифосфата, $(1,3,4,5)\text{IP}_4$, при действии 3-киназы (3K) (по Putney, 1997).

По-видимому, при передаче сигнала с помощью гидролиза фосфоинозитидов пути внутриклеточной сигнализации могут

раздваиваться. Это связано с тем, что гидролиз PIP_2 приводит к образованию двух вторичных посредников: IP_3 и DAG.

Роли разных ветвей фосфоинозитидного пути передачи сигнала могут быть исследованы с помощью химических соединений, имитирующих действие IP_3 или DAG. Так, эффект DAG сходен с действием форболовых эфиров, активирующих протеинкиназу C. Форболовые эфиры выделены из масла семян восточноазиатского древесного растения *Croton tiglium* и обладают мощным канцерогенным действием – резко ускоряют инициацию опухолей канцерогенами. Сродство наиболее активного форболового эфира – ТРА (12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата) к протеинкиназе C чрезвычайно высоко: значения соответствующих констант диссоциации комплекса достигают 60 пМ (Nishizuka, 1984, 1988). Действие IP_3 имитируется кальциевыми ионофорами – A23187, иономицином.

Между ветвями фосфоинозитидного пути существует синергизм: форболовый эфир и Ca^{2+} -ионофор инициируют деление ряда клеток. Фосфоинозитиды контролируют такие процессы, как секреция гормонов, транспорт ионов, размножение клеток (Berridge, Irvine, 1989; Berridge, 1993).

4.2.1. Структура и регуляция фосфолипазы C

Ключевой фермент фосфоинозитидного пути ФЛС идентифицирован во всех клетках млекопитающих, у растений и микроорганизмов. В тканях млекопитающих ФЛС представлена несколькими изоформами, которые различаются по мол. массе, изоэлектрической точке, pH-зависимости, первичной структуре (Crooke, Bennet, 1989; Rhee et al., 1989). Все известные к настоящему времени изоформы ФЛС разделяют на три основные группы: β , γ и δ . Однако внутри этих групп также выявляются различные изоферменты. Мол. массы изоформ ФЛС составляют: 150 кДа (ФЛС- β 1), 145 кДа (ФЛС- γ 1), 85 кДа (ФЛС- δ 1) (Rhee et al., 1989; Morris et al., 1990). У млекопитающих идентифицировано 10 изоформ ФЛС, включая четыре β , две γ и четыре δ изоформы. Первичная структура трех основных групп ФЛС сильно отличается друг от друга: в их аминокислотных последовательностях выявляются только два гомологичных домена - X и Y, состоящие из 170 и 260 аминокислот, соответственно. Эти X и Y участки формируют структуру каталитического центра фермента. Кроме того, все изоформы ФЛС содержат один или два PH-домена (pleckstrin-homology domains), которые представляют собой белковые модули из 100 аминокислот. PH-домен обнаружен на N-терминальном участке, предшествующем X-домену, во всех трех изоформах ФЛС (Lee, Rhee, 1995). ФЛС- γ содержит

также дополнительный РН-домен, расположенный между X- и Y-доменами. В изоформах β и δ каталитические X- и Y-домены разделены короткой последовательностью из 50-70 аминокислот. В то же время, в ФЛС- γ между X- и Y-доменами находится длинная последовательность из 400 аминокислот, включающая SH-домены (src-homology domains) - два SH₂-домена и один SH₃-домен. SH₂- и SH₃-домены представляют собой малые белковые модули из 100 и 50 аминокислот соответственно, участвующие в белок-белковых взаимодействиях. SH₂-домен взаимодействует с белками, содержащими фосфорилированный остаток тирозина, включенный в специфическую последовательность аминокислот. SH₃-домен связывается с короткими аминокислотными последовательностями, содержащими пролин, присутствующими, например, в белках цитоскелета (Lee, Rhee, 1995).

Большое разнообразие изоформ ФЛС и их сложная структура свидетельствуют о существовании различных путей регуляции этой ключевой реакции обмена фосфоинозитидов. Установлено по меньшей мере два механизма активации гидролиза фосфоинозитидов: путем тирозинового фосфорилирования и с участием G-белков (Morris et al., 1990; Rhee, 1991; Rhee, Choi, 1992; Nishizuka, 1995). Рецепторы большинства гормонов, повышающих $[Ca^{2+}]_i$, сопряжены с ФЛС с помощью G-белков, а рецепторы факторов роста активируют ФЛС путем тирозинового фосфорилирования. γ -изоформы ФЛС активируются рецепторными или цитоплазматическими тирозинкиназами (Rhee, 1991; Wahl et al., 1992). Так, связывание эпидермального фактора роста или фактора роста тромбоцитов с рецепторами, имеющими собственную тирозинкиназную активность, вызывает димеризацию рецепторов, активацию тирозинкиназы и быстрое аутофосфорилирование рецепторов. В результате аутофосфорилирования рецепторов образуются участки для связывания SH₂-доменов ФЛС- γ 1 или ФЛС- γ 2. В результате происходит фосфорилирование остатков тирозина 771, 783 и 1254 на ФЛС- γ 1 или остатков тирозина 753 и 759 на ФЛС- γ 2 (экспрессированной в основном в гематопозитических клетках). После фосфорилирования по тирозину ФЛС- γ 1 и ФЛС- γ 2 транслоцируются из цитоплазмы к мембране и вызывают гидролиз фосфоинозитидов (Nishizuka, 1995). Обнаружено также, что фосфорилирование тирозина ФЛС- γ 1 приводит к ее транслокации к актиновым филаментам; во взаимодействии с филаментами участвует SH₃-домен ФЛС- γ 1 (Yang et al., 1994). Можно предположить, что это взаимодействие с цитоскелетом способствует транслокации фермента к его субстрату в мембране.

Активация β -изоформ ФЛС происходит при взаимодействии агонистов с рецепторами, связанными с G-белками. Показано, что ФЛС- β 1, ФЛС- β 2 и ФЛС- β 3 активируются α -субъединицами G_q-белков (Smrcka

et al., 1991; Smrcka, Sternweis, 1993; Lee, Rhee, 1995). ФЛС-β3 и в меньшей степени ФЛС-β2 и ФЛС-β1 также активируются βγ-субъединицами G-белков (Camps et al, 1992; Smrcka, Sternweis, 1993). α_q-субъединицы G_q-белков и βγ-димеры G-белков взаимодействуют с разными участками ФЛС-β. α_q-субъединицы связываются с C-терминальным фрагментом, следующим за Y-доменом, в то время как βγ-димеры взаимодействуют с N-терминальным участком, предшествующим X-домену (Lee, Rhee, 1995). Наличие разных участков связывания для α_q- и βγ-субъединиц свидетельствует о том, что β-изоформы ФЛС могут аддитивно активироваться α_q- и βγ-субъединицами.

В последнее время показано, что рецепторы, связанные с G-белками, активируют не только β-изоформы ФЛС, но могут стимулировать и ФЛС-γ1 (Dhar, Shukla, 1994).

Каталитическая активность всех изоформ ФЛС зависит от Ca²⁺ (Crooke, Bennet, 1989). Центр связывания Ca²⁺ находится, по-видимому, на самой молекуле ФЛС. Показано, что ФЛС-δ и ФЛС-γ имеют последовательности, сходные с так называемой EF-рукой - доменом, обеспечивающим высокоаффинное связывание Ca²⁺ в кальмодулине и некоторых других Ca²⁺-связывающих белках (Bairoch, Cox, 1990). ФЛС очень специфична в отношении фосфоинозитидов и практически не гидролизует другие типы фосфолипидов. Предпочтительными субстратами являются PIP₂ и фосфатидилинозитол-4-фосфат (PIP).

В структуре всех изоформ ФЛС отсутствуют гидрофобные фрагменты, которые могли бы обеспечивать их взаимодействие с мембраной (Crooke, Bennett, 1989; Rhee et al., 1989). Тем не менее, с помощью специфических антител можно идентифицировать связанные с мембранами γ-изоформы (Rhee et al., 1989). До сих пор остаются неясными механизмы связи ФЛС с мембраной. Возможны как специфическая ассоциация с какими-либо белковыми (G-белки, рецепторы агонистов) и/или липидными компонентами мембран, так и посттрансляционные модификации типа ацилирования жирными кислотами (Morris et al., 1990).

4.2.2. Фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP₂)

Активация ФЛС приводит не только к образованию двух вторичных мессенджеров DAG и IP₃, но и к уменьшению концентрации PIP₂, являющегося минорным компонентом мембранных липидов. При стимуляции клеток может гидролизироваться до 50% от общего количества PIP₂ в клетке. Известно также, что весь клеточный пул PIP₂ не доступен для ФЛС. Следовательно, в области активированной ФЛС концентрация

PIP₂ может упасть практически до нуля и оставаться на этом уровне до нового синтеза. В последнее время стало очевидным, что PIP₂ является важным компонентом нескольких путей внутриклеточной сигнализации, и флуктуации концентрации PIP₂ могут играть мессенджерную роль в клетке (Lee, Rhee, 1995). Так, показано, что PIP₂ служит кофактором для фосфолипазы D, вызывающей гидролиз фосфатидилхолина до фосфатидной кислоты и холина. Кроме того, PIP₂ служит участком связывания в мембране для белков, содержащих PH-домены (Harlan et al., 1994). PH-домен обнаружен во многих сигнальных белках, таких как плекстрин, во всех изоформах ФЛС, в киназе β-адренергических рецепторов. PIP₂ участвует в локализации этих белков на поверхности мембраны. Таким образом, уменьшение концентрации PIP₂ при активации ФЛС может приводить к освобождению многих сигнальных белков с поверхности мембраны (Lee, Rhee, 1995).

Обнаружено также, что PIP₂ регулирует сборку/разборку актиновых филаментов в клетке (Aderem, 1992; Luna, Hitt, 1992; Janmey, 1994; Martin, 1998). Показано, что PIP₂ может взаимодействовать с целым рядом актин-связывающих белков: профилином, изолирующим мономеры актина; гельзолином, виллином, северином, разрывающими ("разрезающими") актиновые филаменты; α-актинином, сшивающим актиновые филаменты между собой (Fukami et al., 1994; Janmey, 1994, 1998). Взаимодействие актин-связывающих белков с PIP₂ обычно способствует полимеризации актина, в то время как связывание этих белков с Ca²⁺ приводит к деполимеризации актиновых филаментов. Таким образом, снижение уровня PIP₂ в совокупности с увеличением [Ca²⁺]; способствует деполимеризации филаментов (Lee, Rhee, 1995).

В опытах *in vitro* показано, что PIP₂ прочно связывается с профилином (мол. массой 12-15 кДа), что приводит к диссоциации комплекса профилина с актином, освобождению мономеров актина и полимеризации актиновых филаментов (Aderem, 1992; Lee, Rhee, 1995). В интактных клетках профилин прочно связан с PIP₂ и не участвует в перестройках цитоскелета. Кроме того, PIP₂, связанный с профилином, не доступен для гидролизующего действия различных изоформ ФЛС. Обнаружено, однако, что при активации рецепторов с собственной тирозинкиназной активностью (рецепторов ЭФР, рецепторов фактора роста тромбоцитов) и при фосфорилировании по тирозину ФЛС-γ1, фосфорилированная ФЛС-γ1 может вызывать гидролиз PIP₂, связанного с профилином (Goldschmidt-Clermont et al., 1991).

В лейкоцитах (в частности в макрофагах) основным актин-связывающим белком является гельзолин (мол. масса 90 кДа) (Pettit, Fay, 1998). Ультраструктурные иммуногистохимические данные свидетельствуют о том, что в макрофагах и тромбоцитах гельзолин взаимодействует с плазматической мембраной и мембранами

внутриклеточных органелл (эндоплазматический ретикулум, митохондрии) (Hartwig et al., 1989). Гельзолин связывается в мембране с PIP_2 и препятствует гидролизующему действию ФЛС (Sun et al., 1997). При увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$ до микромолярных значений гельзолин освобождается в цитоплазму и связывается с актиновыми филаментами (Wang et al., 1997). В присутствии микромолярных концентраций Ca^{2+} гельзолин блокирует "оперенный", или быстро растущий, конец актиновых филаментов и вызывает в конечном итоге фрагментацию филаментов (Howard et al., 1990).

Представляют интерес полученные в последнее время данные о том, что PIP_2 может прямо взаимодействовать с IP_3 -рецептором в мембране эндоплазматического ретикула. С использованием методики встраивания IP_3 -рецептора в бимолекулярную липидную мембрану, показано, что IP_3 -рецептор из мозжечка крысы образует стабильный ингибиторный комплекс с эндогенным PIP_2 (Lupu et al., 1998). Разрушение этого комплекса при действии специфических моноклональных антител против PIP_2 приводит к увеличению активности IP_3 -рецептора и повышению его сродства к IP_3 . Добавление экзогенного PIP_2 приводит к блокированию связывания IP_3 с рецептором и ингибированию активности IP_3 -рецептора. Предполагают, что PIP_2 взаимодействует с IP_3 -связывающим участком IP_3 -рецептора. Авторы предлагают новый вариант модели сопряжения, в соответствии с которым IP_3 -рецептор, расположенный в мембране эндоплазматического ретикула, прямо связан с PIP_2 , локализованным в плазматической мембране. В нестимулированных клетках, часть IP_3 -рецепторов ингибирована вследствие взаимодействия с PIP_2 . Стимуляция клеток агонистами вызывает активацию ФЛС, расщепляющей эту связь, что приводит к одновременному удалению ингибитора (PIP_2) и продукции активатора (IP_3). Образовавшийся IP_3 активирует IP_3 -рецептор и индуцирует мобилизацию Ca^{2+} из депо (Lupu et al., 1998).

В последние годы обнаружено также, что PIP_2 участвует в регуляции активности K^+ -каналов входящего выпрямления, управляемых G-белками, которые, как известно, независимо активируются $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков и внутриклеточными ионами Na^+ (Petit-Jacques et al., 1999). Установлено, что $\beta\gamma$ -субъединицы и Na^+ связываются с C-концевым фрагментом канала и способствуют его взаимодействию с PIP_2 (Karschin, 1999; Ho, Murrell-Lagnado, 1999; Logothetis, Zhang, 1999; Rohacs et al., 1999).

Для АТФ-чувствительных K^+ -каналов (имеющих характеристики входящего выпрямления) также установлена модуляция фосфоинозидами. Показано, что PIP_2 конкурирует с АТФ за связывание с каналом, уменьшает чувствительность канала к блокирующему

действию АТФ и стабилизирует открытое состояние канала (Fan, Makielski, 1999; Koster et al., 1999).

4.2.3. Структура и регуляция протеинкиназы C

Образовавшийся при гидролизе PIP_2 DAG активирует второй ключевой фермент фосфоинозитидного пути - протеинкиназу C (ПКС). В настоящее время ПКС обнаружена во всех исследованных тканях млекопитающих за исключением зрелых безъядерных эритроцитов, а также в тканях других типов животных (Nishizuka, 1984, 1986). В тканях млекопитающих идентифицировано 11 изоформ ПКС, которые подразделяют на 3 группы: классические (кПКС), новые (нПКС) и атипичные (аПКС) ПКС (Nishizuka, 1988, 1992, 1995). Классические ПКС включают α , βI , βII и γ изоформы. В макрофагах крысы идентифицированы β и δ изоформы ПКС, относящиеся к кПКС и нПКС, соответственно (Dieter, Fitzke, 1993).

ПКС представляет собой полипептидную цепь (670-690 аминокислот, мол. масса 77 кДа), состоящую из двух функционально различных доменов - регуляторного и каталитического. N-терминальная часть регуляторного домена кПКС содержит два консервативных участка C1 и C2, играющих решающую роль в регуляции активности фермента. В нПКС и аПКС участок C2 отсутствует. C-терминальная часть фермента включает два дополнительных консервативных фрагмента C3 и C4. Участок C3 связывает АТФ, а фрагмент C4 отвечает за связывание белковых субстратов. Фрагмент C1 содержит псевдосубстратную последовательность и два богатых цистеином и содержащих цинк пальцеобразных участков. Эту структуру называют цинковой бабочкой (zinc butterfly), так как она связывает два атома цинка. Именно с цинковым пальцеобразным участком связываются DAG и фторболовый эфир. Фрагмент C2 в регуляторном домене классических кПКС определяет чувствительность фермента к Ca^{2+} . Этот фрагмент взаимодействует с фосфолипидами Ca^{2+} -зависимым образом и участвует в транслокации ПКС к мембране при увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$. Изоформы протеинкиназы C нПКС и аПКС, не имеющие фрагмента C2, не зависят от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Nishizuka, 1992, 1995).

Классические кПКС активируются Ca^{2+} , DAG, кислым фосфолипидом ФС, цис-ненасыщенными жирными кислотами. DAG активирует изоформы кПКС таким образом, что повышается их сродство к микромолярным концентрациям Ca^{2+} . Совместное действие DAG и цис-ненасыщенных жирных кислот еще больше повышает сродство изоформ кПКС к Ca^{2+} и вызывает полную активацию фермента при обычной концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Изоформы нПКС активируются DAG и

ФС, а изоформы α ПКС - Ca^{2+} -ФС и дис-ненасыщенными жирными кислотами (Nishizuka, 1992, 1995).

В нормальных условиях ПКС находится в основном в цитозоле в неактивной форме. При стимуляции происходит транслокация фермента к плазматической мембране, элементам цитоскелета, ядру. В мембране образуется комплекс ПКС-DAG- Ca^{2+} -ФС. ПКС взаимодействует электростатически с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран. В связывании с липидами участвуют также два богатых цистеином пальцеобразных участка фрагмента C1, фрагмент C2 и псевдосубстратная последовательность фермента (Nishizuka, 1992, 1995).

ПКС связывается со специфическими заякоривающими белками, расположенными в различных участках клетки: аннексинами, белками цитоскелета, ядерными белками. В последнее время клонированы внутриклеточные белки с мол. массой 30-36 кДа, являющиеся рецепторами для активированной ПКС. Эти белки были названы RACKs (receptors for activated C-kinase) (Mochly-Rosen et al., 1991; Ron et al., 1994; Mochly-Rosen, 1995). RACKs специфически связывают ПКС только в присутствии ее активаторов (DAG, ФС, Ca^{2+}) и способствуют ее транслокации к мембране. Так, из мозга крыс клонирован белок RACK1 (мол. масса 36 кДа), являющийся гомологом β -субъединицы G-белков (Ron et al., 1994). Связывание с RACKs обеспечивает, по-видимому, определенную локализацию специфических изоформ ПКС в клетке и их компартиментализацию с субстратами.

Для выявления участия ПКС в различных клеточных процессах используют активатор протеинкиназы С форболовый эфир РМА (4-форбол-12-миристат-13-ацетат) (рис. 13). РМА и ряд других форболовых эфиров легко проникают в клетку и, имея структурное сходство с DAG, взаимодействуют с его участком связывания на молекуле ПКС (Nishizuka, 1984, 1988). В связи с этим, форболовые эфиры широко используются как прямые активаторы ПКС.

Известно много ингибиторов ПКС: стауроспорин, дибукаин, тетракаин, хлорпромазин, спермин, сфингозин. Специфическими ингибиторами ПКС являются кальфостин С (Kobayashi et al., 1989), хелеритрин и соединение Н-7 (1-(5-изохинолин сульфонил)-2-метилпиперазин) (Hidaka et al., 1984; Kawamoto, Hidaka, 1984; Hidaka, Kobayashi, 1992) (рис. 13).

α -изоформа кПКС стимулируется нормальными спиртами. Показано, что спирты изменяют структуру липидной фазы мембраны и увеличивают связывание ПКС с мембраной (Shen et al., 1999).

Для того, чтобы ответ клеток на стимул был регулируемым, необходимо существование систем, прекращающих действие вторичных посредников. Влияние IP_3 прекращается с помощью фосфатаз, дефосфорилирующих это соединение. Действие DAG может

ограничиваться с помощью двух механизмов. Благодаря действию диацилглицеринкиназы он может быть фосфорилирован до фосфатидной кислоты, либо гидролизован с помощью диацилглицеринлипазы. Оказалось, что продукты этих путей деградации DAG имеют свою важную роль в процессах регуляции функциональной активности клетки (Berridge, Irvine, 1989; Berridge, 1993). Во-первых, фосфатидная кислота может участвовать в регуляции входа ионов Ca^{2+} в клетки. Во-вторых, во втором положении остатка глицерина фосфоинозитидов обычно находится арахидоновая кислота, которая и освобождается из DAG (диацилглицеринлипаза) или из фосфатидной кислоты (фосфолипаза A_2). В настоящее время показано, что освобождение арахидоновой кислоты часто сопровождает процессы активации клеток, связанные с увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$, и что арахидоновая кислота и многочисленные ее продукты являются еще одной сигнальной системой в клетках.

4.3. Арахидоновая кислота и ее продукты: участие в процессах внутриклеточной сигнализации

В последние годы получены данные, позволяющие рассматривать арахидоновую кислоту (АК) и ее продукты в качестве еще одной системы вторичных посредников (Bevan, Wood, 1987). Во многих случаях показано, что АК и ее производные могут взаимодействовать с другими системами передачи информации в клетке, модулируя их сигналы (Axelrod et al., 1988; Axelrod, 1990). Обнаружено, что АК или ее продукты могут влиять на активность ФЛС (Mire-Sluis et al., 1989; Murphy, Welk, 1989), АЦ (Bitonti et al., 1980), гуанилатциклазы (Gerzer et al., 1986; Waldman, Murad, 1987), ПКК (McPhail et al., 1984; Shearman et al., 1989) и приводить к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Wolf et al., 1986; Chow, Jondal 1990). Показано, что в передаче сигнала от рецептора к фосфолипазе A_2 – основному ферменту, ответственному за образование свободной АК, - участвуют G-белки (Axelrod et al., 1988; Axelrod, 1990; Burch, 1990; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992б).

Показано, что АК и ее метаболиты, выделяясь из клеток, могут выступать в качестве местных гормонов и медиаторов, активируя рецепторы той же клетки или окружающих клеток, играя при этом важную роль в регуляции различных физиологических процессов, таких как иммунный ответ, секреция и др. (Irvine, 1982; Needleman et al., 1986; Burgoyne et al., 1987; Axelrod et al., 1988; Nozawa et al., 1991; Liscovitch, Cantley, 1994). Содержание АК и ее метаболитов в организме увеличивается при многих патологических состояниях: при воспалительных процессах (Davies et al., 1984), атеросклерозе (Hajjar, Pomerantz, 1992), ишемической болезни сердца (Huang et al., 1992).

Механизмы образования свободной АК в клетках, пути метаболизма АК и производства очень широкого спектра биологически активных соединений (эйкозаноидов) подробно рассмотрены нами ранее (см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1993).

4.3.1. Механизмы образования свободной арахидоновой кислоты в клетках

Арахидоновая (эйкозатетраеновая) кислота представляет собой полиненасыщенную жирную кислоту (20:4) и является основным компонентом фосфолипидов клеточных мембран. В клетках млекопитающих АК находится в глицерофосфолипидах предпочтительно в положении sn-2 (Irvine, 1982). В эндотелиальных клетках АК входит главным образом в состав фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола (Whatley et al., 1990). В тромбоцитах АК содержится в фосфатидилхолине, фосфатидилэтанолаmine, фосфатидилсерине и фосфатидилинозитоле (Nozawa et al., 1991). В макрофагах АК составляет 25% жирных кислот мембран (Scott et al., 1980).

АК освобождается из клеточных мембран в ответ на рецепторзависимую и рецепторнезависимую стимуляцию различных клеток (Needleman et al., 1986; Axelrod et al., 1988; Axelrod, 1990).

Различают несколько механизмов освобождения АК из фосфолипидов мембран (Irvine, 1982; Axelrod et al., 1988; Axelrod, 1990; Rana, Hokin, 1990). 1. Наиболее прямой механизм включает в себя непосредственное освобождение АК из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипазы A_2 . Фосфолипазы A_2 катализируют гидролиз сложноэфирной связи между АК и глицерофосфолипидом в положении sn-2. Эти фосфолипиды включают в себя фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитиды, фосфатидную кислоту и плазмалогены. В результате гидролиза образуются свободная АК и лизофосфолипиды. 2. Менее прямой механизм состоит в освобождении АК из диацилглицерола (1-ацил-2-арахидоноил глицерола) при действии диацилглицероллипазы. Диацилглицерол образуется при воздействии фосфолипазы C на некоторые фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин и фосфатидилинозитол. Ингибитором диацилглицероллипазы является агент RHC 80 267 (Weiss, Insel, 1991). 3. Кроме того, диацилглицерол может активировать протеинкиназу C, которая в свою очередь стимулирует фосфолипазу A_2 , катализирующую освобождение АК из фосфолипидов (Whatley et al., 1990). 4. Возможно также образование АК в результате активации мембранных рецепторов (например, рецепторов

эпидермального фактора роста), приводящей к стимуляции связанной с ними тирозинкиназы, которая в свою очередь непосредственно активирует фосфолипазу A_2 (Peppelenbosch et al., 1992). Фосфолипаза A_2 катализирует освобождение АК из фосфолипидов мембран. Образование свободной АК в результате действия фосфолипазы A_2 ингибируется производными гидроксibenзилидинмалононитрила, известными как тирфостины и являющимися специфическими блокаторами тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста (Holowka, Baird, 1992). 5. Диацилглицерол может фосфорилироваться диацилглицеролкиназой с образованием фосфатидной кислоты. АК освобождается из фосфатидной кислоты при действии фосфолипазы A_2 . Ингибитором 1,2-диацилглицеролкиназы служит соединение R59022.

В различных клетках реализуется один или несколько механизмов образования свободной АК. Полагают, например, что в фагоцитах (макрофагах) АК освобождается из мембран в основном в результате действия фосфолипазы A_2 (Hamilton, Adams, 1987; Leslie et al., 1988; Wijkander, Sundler, 1989; Balsinde et al., 1990, 1992). В эндотелиальных клетках в освобождении АК участвуют, по-видимому, и фосфолипаза A_2 , и фосфолипаза C (Whatley et al., 1990). Для эндотелиальных клеток показано также участие протеинкиназы C в регуляции продукции АК. Протеинкиназа C активирует фосфолипазу A_2 , катализирующую выделение АК (Carter et al., 1989; Whatley et al., 1989).

В тромбоцитах человека только 12-15% АК высвобождается с участием фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы C и диацилглицероллипазы (механизм 2). Основная же часть свободной АК образуется при прямом действии фосфолипазы A_2 (Nozawa et al., 1991).

4.3.2. Метаболизм арахидоновой кислоты

Свободная АК легко окисляется с образованием очень широкого спектра биологически активных соединений (эйкозаноидов): простагландинов (включая простаглицлин), тромбоксанов, лейкотриенов, различных гидроксикислот (Needleman et al., 1986; Lapetina, 1990). Известны три энзиматических пути окисления АК: с участием мембранно-связанной циклооксигеназы, цитоплазматических липоксигеназ и эпоксигеназ (цитохром-P-450-подобных ферментов) (Lapetina, 1990 а; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1993) (рис. 14). Тип окисления АК определяется набором ферментов, который содержит данная клетка.

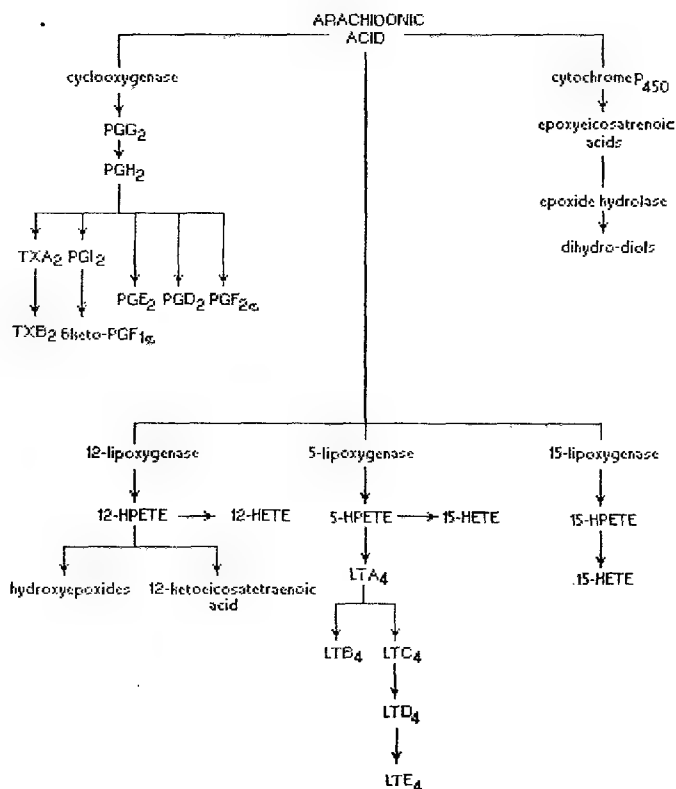


Рис. 14. Схема метаболизма арахидоновой кислоты.

Циклооксигеназный путь окисления АК. Циклооксигеназа является гемсодержащим мембрано-связанным ферментом с мол. массой 70 кДа. В фибробластах циклооксигеназа локализована в мембране эндоплазматического ретикулума и ядерной оболочке (Davies et al., 1984). Для окисления АК циклооксигеназой необходим молекулярный кислород (Needleman et al., 1986). Другие ЖК, такие как эйкозапентаеновая кислота, окисляются циклооксигеназой хуже, чем АК.

Метаболизм АК по циклооксигеназному пути начинается с образования нестабильных промежуточных продуктов, эндопероксидов, после включения двух атомов кислорода в молекулу АК в положениях С-11 и С-15. Дальнейшими продуктами превращений являются простагландины (ПГ) и тромбоксаны (ТК), нестабильные, но имеющие

важные биологические свойства соединения, особенно ПГ- I_2 (простациклин) и ТК- A_2 .

В тромбоцитах крови человека основным продуктом эндопероксидов является ТК- A_2 (Lapetina, 1990; Nozawa et al., 1991) – вазоконстриктор, который вызывает сокращение гладких мышц сосудов (сужение сосудов), агрегацию тромбоцитов, а также сужение бронхов (Davies et al., 1984; Siess, 1989; Lapetina, 1990; Nozawa et al., 1991). Простагландины D_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$ ингибируют функциональную активность тромбоцитов (Nozawa et al., 1991).

В эндотелиальных клетках АК преимущественно окисляется по циклооксигеназному пути. Основным продуктом эндопероксидов в эндотелиальных клетках сосудов является ПГ- I_2 (Lapetina, 1990; Whatley et al., 1990), который расширяет сосуды, ингибирует агрегацию тромбоцитов и сужение бронхов (Davies et al., 1984; Lapetina, 1990 a). Простациклин также стимулирует аденилатциклазу, повышающую внутриклеточную концентрацию цАМФ (Lapetina, 1990). Кроме ПГ- I_2 в эндотелиальных клетках синтезируются также простагландины D_2 , E_2 и $F_{2\alpha}$ (Whatley et al., 1990).

Широко используемыми ингибиторами циклооксигеназы являются нестероидные противовоспалительные агенты: индометацин, аспирин, 1-фенил-3-пиразолидинон, анальгин, бутадиион, амидопирин, ибупрофен и кетопрофен (рис. 15). Установлено, что аспирин избирательно ацетилирует остаток Сер-530 циклооксигеназы, что блокирует доступ АК к субстратсвязывающему участку фермента (De Witt et al., 1990). Предположительное ацетилирование Сер-530 аспирином обусловлено специфическим связыванием салицилатной группы с этим участком циклооксигеназы (Wells, Marnett, 1992).

Липоксигеназный путь окисления АК. Липоксигеназы представляют собой цитоплазматические ферменты, катализирующие включение одной молекулы кислорода в АК с образованием гидропероксипроизводных – гидропероксидыкозатетраеновых кислот (ГПЭТЕК). Гидропероксигруппа может находиться при 5, 11, 12 или 15-м атоме углерода АК (5-ГПЭТЕК, 11-ГПЭТЕК и т. д.). Благодаря пероксидазной активности, связанной с липоксигеназами, гидропероксипроизводные АК могут восстанавливаться до гидроксипроизводных – моногидроксидыкозатетраеновых кислот (ГЭТЕК).

Первой описанной липоксигеназой из тканей млекопитающих была 12-липоксигеназа, хотя наибольшее значение имеет метаболизм АК, связанный с активностью 5-липоксигеназы, приводящей к образованию биологически активных лейкотриенов (Davies et al., 1984; Lapetina, 1990; Ford-Hutchinson, 1990). Лейкотриены являются медиаторами

аллергических и воспалительных процессов. Эти производные синтезируются в нейтрофилах, эозинофилах, моноцитах, тучных клетках, макрофагах и других клетках.

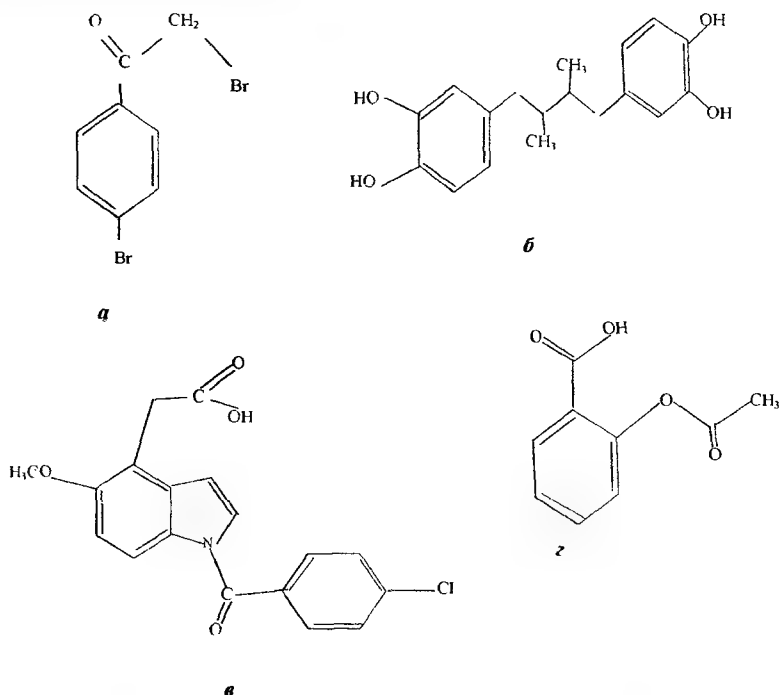


Рис. 15. Структура наиболее известных ингибиторов метаболизма арахидоновой кислоты.

а - 4-бромфенацилбромид, *б* - нордигидрогуаретиковая кислота, *в* - индометацин, *г* - аспирин.

Классическими ингибиторами липоксигеназ являются нордигидрогуаретиковая кислота (НДГК) (рис. 15), 3-амино-1-3-(трифторметил) фенил-2-пиразолин (BW755C) (Turk et al., 1985; Needleman et al., 1986), этакриновая кислота, кетоконазол, лонапален, 15-ГЭТЕК (Male et al., 1987), фенидон и 5,8,11-эйкозатрииновая кислота (ЭТИК) (Byczkowski et al., 1992). Обнаружены специфические

ингибиторы 5-липоксигеназы: А-63162, WY-50295 (Huang et al., 1992), 2,3,5-триметил-6-(12-гидрокси-5,10-додекадиинил)-1,4-бензохинон (АА-861) (Yoshimoto et al., 1982), фускозид – противовоспалительный агент из морских организмов (Jacobson, Jacobs, 1992 а, 1992 б). Эффективными блокаторами 5-липоксигеназы также являются флавоноид циркулиол (Yoshimoto et al., 1983), коффеиновая кислота и ее метиловый эфир (Koshihara et al., 1984). 12-липоксигеназа из тромбоцитов специфически ингибируется флавоноидом байкалейном (Sekiya, Okuda, 1982). Эскулетин (6,7-дигидроксикумарин) блокирует 5-липоксигеназу из клеток мастоцитомы и 12-липоксигеназу из тромбоцитов. 5-липоксигеназа и 12-липоксигеназа блокируются фенотиазиновыми производными хлорпромазином, флуфеназином и трифлуоперазином (Hamasaki, Tai, 1985). Наиболее эффективным и специфическим ингибитором 5- и 12-липоксигеназ является госсипол – полифенольное соединение из хлопчатника. В концентрациях 0,3 и 0,7 мкМ госсипол вызывает 50%-ное блокирование 5- и 12-липоксигеназ из лейкоцитарных базофилов крысы. Как и эскулетин, госсипол более избирательно действует на 5-липоксигеназу (Hamasaki, Tai, 1985). 5,8,11,14-эйкозатетраиновая кислота ингибирует 12- и 15-липоксигеназы, а также цитохром Р-450 (Cardevila et al., 1988). α -Токоферол эффективно блокирует активность 5- и 15-липоксигеназ в опытах *in vitro* и *in vivo* (Бакалова и др., 1988). Предполагают, что способность ингибировать липоксигеназу является неотъемлемым свойством фенольных соединений (Dohi et al., 1991).

Эпоксигеназный путь окисления АК. В мембранах эндоплазматического ретикулума практически всех клеток локализована система монооксигеназного окисления, обладающая смешанными функциями и низкой субстратной специфичностью. Ее основной компонент цитохром Р-450 (цит. Р-450), названный так за характерный спектр поглощения восстановленного комплекса с СО в области 450 нм, был выделен и подробно изучен в середине 70-х годов (Needleman et al., 1986). В клетках некоторых тканей (кора надпочечников) монооксигеназная система локализована в мембранах митохондрий.

В микросомной системе окисления происходит метаболизм практически всех липофильных субстратов: эндогенных соединений, таких как стероидные гормоны, холестерин, липорастворимые витамины, простагландины и ЖК; экзогенных соединений (ксенобиотиков) – гидрофобных ядов, лекарств, канцерогенных веществ, пестицидов, инсектицидов.

Окисление гидрофобных субстратов в микросомах идет по трем основным путям: 1) включение атома кислорода между атомом водорода и каким-либо другим атомом молекулы субстрата (реакция гидроксирования); 2) присоединение дополнительного атома кислорода

по π -связи (эпоксидирование); 3) присоединение атома кислорода к паре свободных электронов.

Установлено, что кроме метаболизма по циклооксигеназному и липоксигеназному путям АК и ее продукты могут окисляться с участием цитохром-Р-450-подобных ферментов в основном до эпоксидов (Needleman et al., 1986; Lapetina, 1990).

Р-450 монооксигеназная система широко распространена в природе. Обнаружено, что у млекопитающих она связана со всеми мембранными фракциями клетки, главным образом с эндоплазматическим ретикулулом и митохондриями. Цитохомы Р-450 относятся к особому суперсемейству ферментов-монооксигеназ и представляют собой амфипатические белки молекулярной массой 57 кДа (500 аминокислот). Цитохомы Р-450 из эндоплазматического ретикулума являются интегральными мембранными белками, заякоренными в мембране с участием одного или двух трансмембранных сегментов, расположенных на N-конце молекулы. Большой каталитический гем-содержащий домен цитохрома Р-450 расположен на цитоплазматической поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума (Black, 1992).

Эффективными блокаторами эпоксигеназ являются антимикотические агенты имидазольной природы – эконазол, проадифен, клотримазол, миконазол, кетоконазол (Capdevila et al., 1988; Piomelli, Greengard, 1990).

Одним из наиболее изученных объектов, в котором исследована роль АК и ее продуктов в процессах функционирования клеток, являются макрофаги.

4.3.3. Метаболизм арахидоновой кислоты в макрофагах

Макрофаги играют ведущую роль в процессах фагоцитоза, а также выступают как вспомогательные клетки в других иммунологических реакциях (Adams, Hamilton, 1984). Одним из ключевых событий в активации макрофагов является продукция большого количества эйкозаноидов, продуктов метаболизма АК (Scott et al., 1980). Поэтому именно на примере макрофагов можно более подробно рассмотреть конкретные пути метаболизма и функционирование АК и ее продуктов.

Макрофаги, возникающие в ходе дифференцировки из особых клеток-предшественников, которые находятся в костном мозге, заселяют все без исключения органы и ткани. Макрофаги являются мигрирующими фагоцитирующими клетками, играющими важную роль в иммунных и воспалительных процессах, главным образом благодаря их способности секретировать биоактивные молекулы (Adams, Hamilton, 1984; Hamilton, Adams, 1987). Эта функция регулируется различными внешними

стимулами, включающими матрикс, к которому макрофаги прилипают, и связывание цитокинов с мембранными рецепторами. Активация макрофагов включает изменение морфологии клеток, реорганизацию цитоскелета, освобождение цитокинов и секреторных продуктов, усиление пиноцитоза, хемотаксиса, респираторного взрыва, ликвидации микробов и опухолевых клеток (Hamilton, Adams, 1987).

Для выполнения сложных функций мононуклеарных фагоцитов большое значение имеют три типа внутриклеточных структур (Adams, Hamilton, 1984). К первому типу структур следует отнести вакуолярную систему, включающую фагосомы, пиносомы, эндосомы, первичные/вторичные лизосомы и фаголизосомы (Steinman et al., 1983). Даже в резидентных тканевых макрофагах 2 раза в течение часа наблюдается интернализация всей их плазматической мембраны (Steinman et al., 1983). В макрофагах, участвующих в процессах фагоцитоза или воспалительных реакциях, эти реорганизации мембраны существенно увеличиваются (Cohn, 1978). Ко второму типу внутриклеточных структур относится цитоскелетный аппарат макрофагов (Stossel, 1981). Показано, что система микрофиламентов и микротрубочек участвует в выполнении фагоцитарной и секреторной функции макрофагов, а также в связывании опухолевых клеток (Stossel, 1981; Somers et al., 1983). Белки цитоскелета (актин, миозин, аккументин и гельзолин) составляют практически 15% всех белков макрофагов (Stossel, 1981). В то время как количество этих белков может не изменяться при активации макрофагов, функционирование белков цитоскелета может модулироваться при воздействии различных внешних сигналов. Третьей группой внутриклеточных структур, важных для функционирования макрофагов, являются митохондрии (Adams, Hamilton, 1984). Так, обнаружено, что при воспалительных реакциях макрофаги содержат увеличенное число митохондрий (Steinman, Cohn, 1974).

Фагоцитирующие клетки отвечают на воздействие разнообразных агонистов, быстро гидролизуют мембранные фосфолипиды, что приводит к генерации большого числа внутриклеточных и экстраклеточных мессенджеров. Связывание агонистов с рецепторами стимулирует ФЛС, катализирующую гидролиз фосфоинозитидов, в результате образуются два вторичных посредника IP_3 и DAG. IP_3 вызывает мобилизацию Ca^{2+} из депо (Berridge, 1993), а DAG активирует ПКК (Nishizuka, 1988). Активированные фагоциты также продуцируют большие количества свободной АК, предшественника эйкозаноидов, являющихся мощными медиаторами воспаления (Needleman et al., 1986). В макрофагах АК составляет 25% жирных кислот мембран (Scott et al., 1980). Несмотря на существование нескольких механизмов освобождения АК из фосфолипидов мембран (Irvine, 1982; Rana, Hokin, 1990; Крутецкая, Лебедев, 1993) полагают, что в фагоцитах АК освобождается из мембран

в основном в результате прямого действия фосфолипазы A_2 (Hamilton, Adams, 1987; Leslie et al., 1988; Wijkander, Sundler, 1989; Balsinde et al., 1990, 1992). Так, для перитонеальных макрофагов морской свинки показано, что при нейтральных pH (6.0-7.0) фосфолипаза A_2 освобождает АК преимущественно из фосфатидилинозитола. При других значениях pH фосфолипаза A_2 освобождает АК предпочтительно из фосфатидилхолина или фосфатидилэтаноламина (Shibata et al., 1988).

Внутриклеточная концентрация свободной АК очень мала, поэтому лимитирующей стадией биосинтеза эйкозаноидов является освобождение АК из фосфолипидов мембран (Irvine, 1982). В связи с этим, фосфолипаза A_2 считается важнейшим ферментом в патофизиологии макрофагов.

Фосфолипазы A_2 являются Ca^{2+} -зависимыми эстеразами, специфически катализирующими гидролиз сложноэфирной связи между жирной кислотой (ЖК) и 1,2-диацил-3-sn-фосфоглицеридом в положении sn-2. В результате образуются свободная ЖК и лизофосфолипид. В настоящее время фосфолипазы A_2 образуют быстро растущее большое суперсемейство различных ферментов, продукты деятельности которых играют важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации, синтезе эйкозаноидов или фактора активации тромбоцитов, а также общем метаболизме липидов (Dennis, 1994, 1997). Ферменты, входящие в это суперсемейство, различаются по функции, локализации, регуляции, механизму действия, аминокислотной последовательности, структуре и роли в их регуляции двухвалентных катионов. Фосфолипазы A_2 , выделяемые из тканей млекопитающих, подразделяются на внутри- и внеклеточные.

В соответствии со сходством аминокислотной последовательности, известные фосфолипазы A_2 подразделяют на несколько групп (Dennis, 1994, 1997). Фосфолипазы A_2 , относящиеся к традиционным I, II и III группам, являются внеклеточными (секретируемыми), имеют низкую мол. массу (13-15 кДа), 125 аминокислот, высокое содержание дисульфидных связей (5-7), 10-14 остатков цистеина, активируются внутриклеточным Ca^{2+} в миллимолярной концентрации, причем Ca^{2+} необходим для их каталитической активности. Для каталитической активности этих групп фосфолипаз A_2 необходимы консервативные остатки His-48 и Asp-99 (Dennis, 1994). Фосфолипазы A_2 I, II и III групп не имеют специфичности к ЖК, расположенной в положении sn-2 глицерофосфолипида (Kramer et al., 1989; Sielhamer et al., 1989), инактивируются агентами, восстанавливающими дисульфидные связи, такими как дитиотреитол (Vadas et al., 1985). Фосфолипазы A_2 I, II и III групп активны в широкой области pH (7-10), устойчивы к нагреванию и воздействию кислот (Vadas et al., 1985). Эти фосфолипазы A_2 предпочтительно высвобождают ЖК из фосфатидилэтаноламина и ФС и значительно хуже гидролизуют фосфатидилхолин (Mayer, Marshall, 1993). В связи с тем, что 14 кДа

фосфолипазы A_2 II группы присутствуют в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом, предполагают, что эти фосфолипазы A_2 участвуют в воспалительных процессах (Vadas et al., 1985). Низкомолекулярные фосфолипазы A_2 I, II и III групп обнаружены в поджелудочной железе млекопитающих, ядах кобр и морских змей (I группа фосфолипаз A_2); ядах гадюк, ямкоголовых змей, тромбоцитах человека и крысы, печени и селезенке млекопитающих, синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом (II группа фосфолипаз A_2); яде пчел и ящериц (III группа фосфолипаз A_2) (Dennis, 1994, 1997; Mayer, Marshall, 1993; Крутецкая, Лебедев, 1993).

Относительно недавно в цитозоле различных типов клеток обнаружены Ca^{2+} -зависимые фосфолипазы A_2 высокой молекулярной массы, объединяемые в настоящее время в группу IV (Dennis, 1994, 1997). Фосфолипазы A_2 этой группы являются цитоплазматическими, включают 750 аминокислот, 9 остатков цистеина, не содержат дисульфидных связей, не чувствительны к дитиотрентолу, имеют высокую мол. массу (85 кДа) и специфичность к АК, расположенной в положении sn-2 глицерофосфолипидов. Все высокомолекулярные фосфолипазы A_2 активируются *in vitro* Ca^{2+} в субмикромольных концентрациях (Dennis, 1994, 1997). Фосфолипазы A_2 IV группы идентифицированы в цитозоле лейкоцитарных моноцитов человека линии U937 (Clark et al., 1990, 1991; Diez, Mong, 1990; Kramer et al., 1991; Sharp et al., 1991), резидентных перитонеальных макрофагов мыши (Wijkander, Sundler, 1989), макрофагоподобных клеток мышей линии RAW 264.7 (Leslie et al., 1988; Channon, Leslie, 1990) и J 774 (Wijkander, Sundler, 1991, 1992), тромбоцитов человека (Takayama et al., 1991) и других типов клеток.

Фосфолипаза A_2 , идентифицированная в цитозоле перитонеальных макрофагов мыши, имеет мол. массу 70 кДа, максимальную активность при 1,4 мкМ свободного Ca^{2+} , предпочтительно освобождает АК из фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилинозитола. Активность этой фосфолипазы A_2 увеличивается при обработке макрофагов активатором ПКС форболовым эфиром РМА. Фосфолипаза A_2 в перитонеальных макрофагах активна в широкой области pH (7-10); при pH < 6 активность фермента резко падает. Фосфолипаза A_2 ингибируется нордигидрогуаретиковой кислотой, флавоноидом кверцетином и классическим ингибитором фосфолипаз A_2 4-бромфенацилбромидом. 50%-ное подавление активности фермента наблюдается при концентрации 4-бромфенацилбромида, равной 15 мкМ (Wijkander, Sundler, 1989).

Представляют интерес данные о том, что повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} инициирует в целых клетках транслокацию из цитозоля и связывание с мембраной высокомолекулярных фосфолипаз A_2 (Channon, Leslie, 1990; Diez, Mong,

1990; Clark et al., 1991; Wijkander, Sundler, 1992). Показано, что Ca^{2+} способствует связыванию цитоплазматических фосфолипаз A_2 группы IV с фосфолипидами мембраны и не участвует в каталитической активности фермента (Wijkander, Sundler, 1992; Dennis, 1994). На N-терминальном конце молекулы высокомолекулярные фосфолипазы A_2 содержат Ca^{2+} -связывающий домен, сходный с таковым в других сигнальных белках, таких как ПКК, ГТФаза-активирующий белок, ФЛС (Clark et al., 1991; Sharp et al., 1991). Присутствие Ca^{2+} -связывающего домена, а также зависимость активности фермента от субмикромольной концентрации Ca^{2+} (0,1-1 мкМ) (Channon, Leslie, 1990; Clark et al., 1990; Kramer et al., 1991) свидетельствует о том, что вызываемое агонистами увеличение $[\text{Ca}^{2+}]$, является важным этапом в транслокации фосфолипазы A_2 к мембране.

Для перитонеальных макрофагов мыши показана прямая корреляция между внеклеточной концентрацией Ca^{2+} , т.е. возможностью входа Ca^{2+} в клетку, и активностью фосфолипазы A_2 . Это позволило предположить, что рецепторзависимый вход Ca^{2+} в макрофаги играет существенную роль в активации фосфолипазы A_2 (Balsinde et al., 1990). Сходные данные получены на других фагоцитирующих клетках - нейтрофилах человека (Reddy et al., 1995), а также на клетках глиомы крысы (Brooks et al., 1989).

Интересно, что другие двухвалентные ионы (Ba^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+}), а также высокие концентрации NaCl или Na_2SO_4 могут с успехом заменять Ca^{2+} и активировать высокомолекулярные фосфолипазы A_2 (Wijkander, Sundler, 1992; Reynolds et al., 1993; Dennis, 1994). Так, в присутствии высокой концентрации соли и в отсутствие Ca^{2+} наблюдается повышение энзиматической активности, что подтверждает предположение о том, что ион металла или соль скорее способствуют связыванию фосфолипазы A_2 с мембраной, нежели изменению каталитической активности фермента (Reynolds et al., 1993).

Обнаружено, что для каталитической активности этих фосфолипаз A_2 необходимы специфические остатки Ser-228, Arg-200 и Asp-549 (Sharp et al., 1994; Pickard et al., 1996).

В последнее время появились данные о том, что активность цитоплазматических фосфолипаз A_2 IV группы эффективно модулируется фосфорилированием (Lin et al., 1993; Mayer, Marshall, 1993; Nemenoff et al., 1993; Dennis, 1994). Фосфорилирование этого фермента *in vivo* приводит к увеличению освобождения АК, а также к некоторому увеличению активности *in vitro*. Обнаружено, что Ser-505 в молекуле фермента фосфорилируется серин-треониновыми киназами: ПКК и протеинкиназой, связанной с микротрубочками (p42 MAP-киназой) (Lin et al., 1993; Nemenoff et al., 1993). Высокомолекулярная фосфолипаза A_2 (мол. масса 85 кДа) в макрофагоподобных клетках линии J774 является

субстратом для фосфорилирования ПКС, активность ее увеличивается при обработке клеток форболовым эфиром ТРА (Wijkander, Sundler, 1991).

Активность высокомолекулярных фосфолипаз A_2 модулируется также G-белками. Так, в пермебилизированных лейкоцитах крысы активатор G-белков ГТФγS в 5-6 раз увеличивает активность фосфолипазы A_2 и освобождение АК (Narasimhan et al., 1990). Добавление ГТФγS к нейтрофилам человека также увеличивает в 3 раза активность 85 кДа фосфолипазы A_2 (Ando et al., 1992). Все вышеизложенное свидетельствует о важной роли высокомолекулярных фосфолипаз A_2 цитозоля в рецепторзависимой передаче сигналов, освобождении АК и образовании эйкозаноидов.

Эффективным блокатором фосфолипаз A_2 является 4-бромфенацилбромид (Roberts et al., 1977; Irvine, 1982; Chang et al., 1987; Glaser et al., 1990; Hazlett et al., 1990; Крутецкая, Лебедев, 1993). 4-бромфенацилбромид необратимо модифицирует (алкилирует) остаток His-48, входящий в состав активного центра фермента.

В последние годы новая форма секреторных фосфолипаз A_2 идентифицирована в тканях человека (Chen et al., 1994a), крысы (Chen et al., 1994b) и макрофагоподобных клетках мыши линии P388D₁ (Balboa et al., 1996). Эти фосфолипазы A_2 объединяют в V группу. Эти секреторные фосфолипазы A_2 имеют мол. массу 14 кДа, 6 дисульфидных связей, 118 аминокислот, активируются Ca^{2+} в миллимолярных концентрациях (Dennis, 1997).

В макрофагоподобных клетках мыши линии P388D₁, являющихся моделью перитонеальных макрофагов (Glaser et al., 1990), обнаружена цитоплазматическая Ca^{2+} -независимая фосфолипаза A_2 с большой мол. массой (80-85 кДа), не содержащая дисульфидных связей, способная образовывать олигомеры с мол. массой 337 кДа (Ackermann et al., 1994, 1995). Эти фосфолипазы A_2 относят к IV группе (Dennis, 1997).

Таким образом, с каждым годом идентифицируются все новые фосфолипазы A_2 , играющие важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации, освобождении АК и синтезе эйкозаноидов. Во многих случаях, в одной и той же клетке присутствует несколько форм фосфолипаз A_2 . Так, в макрофагоподобных клетках линии P388D₁, обнаружены фосфолипазы A_2 , относящиеся ко II и IV группам, а также Ca^{2+} -независимые фосфолипазы A_2 VI группы (Barbour, Dennis, 1993).

АК, освобожденная из мембранных липидов под действием фосфолипазы A_2 , легко окисляется с образованием биологически активных соединений эйкозаноидов.

Эйкозаноиды являются важными медиаторами во многих физиологических и патофизиологических процессах. Количество и специфичность синтезируемых простагландинов или лейкотриенов

зависит не только от оснащенности клетки ферментами, окисляющими АК до соответствующих метаболитов, но и, более того, от типа используемого стимула. По сравнению с другими клетками, макрофаги являются наиболее активными производителями всего спектра эйкозаноидов. Они способны синтезировать и секретировать метаболиты АК в ответ на многие физиологические стимулы, такие как факторы, вызывающие фагоцитоз, иммунные комплексы, факторы комплемента, липополисахариды, эндотоксин (Scott et al., 1980, 1982; Hamilton, Adams, 1987; Kaever et al., 1990) и таким образом непосредственно участвуют в воспалительных и аллергических реакциях.

В перитонеальных макрофагах АК, освобождаемая из мембранных фосфолипидов под действием фосфолипазы A_2 легко окисляется по циклооксигеназному и липоксигеназному путям (Scott et al., 1982; Tripp et al., 1985a, 1985b).

Резидентные перитонеальные макрофаги мыши освобождают большие количества свободной АК при стимуляции зимозаном, конканавалином А, кальциевым ионофором А 23187, или активатором ПКС форболовым эфиром РМА (Balsinde et al., 1990). По эффективности стимуляции освобождения АК агенты выстраиваются в следующий ряд: А 23187 >> зимозан > конканавалин А > РМА. Показано, что предварительная инкубация макрофагов в течение 10 мин с РМА существенно потенцирует освобождение АК при действии других агонистов.

Культивируемые резидентные макрофаги крысы продуцируют небольшие количества свободной АК и простагландина E_2 (Peters-Golden et al., 1990). При стимуляции перитонеальных макрофагов в течение 30 мин активатором ПКС форболовым эфиром РМА (50 нМ) происходит существенное возрастание продукции свободной АК, продуктов ее окисления по циклооксигеназному пути 6-кетопростагландина $F_{1\alpha}$, тромбксана B_2 , простагландина E_2 , простагландина D_2 , а также продукта 12-липоксигеназного пути окисления АК 12-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты. Способность РМА запускать метаболизм АК в перитонеальных макрофагах коррелирует с его возможностью активировать ПКС. В пользу этого свидетельствуют следующие данные. Так, показано, что другой активатор ПКС, проникающий через мембрану аналог DAG 50 мкМ олеил ацетилглицерин также активирует метаболизм АК в перитонеальных макрофагах. В то же время, форбол дидеаноат, не способный активировать ПКС, не влияет на метаболизм АК в макрофагах. Более того, два структурно различных ингибитора ПКС стауроспорин и сфинганин предотвращают вызываемое РМА освобождение АК в перитонеальных макрофагах. В то же время, инкубация с РМА альвеолярных макрофагов крысы не приводит к образованию

эйкозаноидов, а сопровождается только продукцией незначительного количества свободной АК (Peters-Golden et al., 1990).

Обнаружено также, что активация ПКС запускает освобождение и метаболизм АК в различных популяциях макрофагов, включая моноциты периферической крови человека (Kozumbo et al., 1987), резидентные перитонеальные макрофаги мыши (Humes et al., 1982; Wey, Baxter, 1986; Pfannkuche et al., 1989), клетки Купфера (Dieter et al., 1989; Kuiper et al., 1989) и макрофагоподобные клетки линии RAW 204.7 (Burch, 1987). Практически во всех указанных популяциях макрофагов, также как и в перитонеальных макрофагах крысы (Peters-Golden et al., 1990), освобождающаяся при активации ПКС АК окисляется преимущественно по циклооксигеназному, а не по 5-липоксигеназному путям (Humes et al., 1982; Wey, Baxter, 1986; Kozumbo et al., 1987). Так, в макрофагах печени крысы, обработанных РМА, АК окисляется до простагландина E_2 , простагландина D_2 и тромбоксана B_2 (Dieter, Fitzke, 1993).

В резидентных перитонеальных макрофагах мыши и макрофагоподобных клетках линии HA 38, активаторы ПКС форболовый эфир ТРА и синтетические аналоги DAG диоктаноилглицерин и олеоилацетилглицерин стимулируют освобождение АК и продукцию простагландина E_2 , но не лейкотриена C_4 (Kaever et al., 1990). Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} путем добавления Ca^{2+} -ионофоров одновременно с активаторами ПКС приводит не только к образованию простагландина E_2 , но и к активации 5-липоксигеназного пути окисления АК и продукции лейкотриена C_4 . Ингибиторы ПКС сфингозин, тамоксифен, стауроспорин полностью устраняют эффекты ТРА (Kaever et al., 1990). Учитывая, что 5-липоксигеназа в большей степени зависит от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , чем фосфолипаза A_2 (Adarem, Cohn, 1988), а также то, что активация ПКС в общем не связана с повышением $[Ca^{2+}]$; (Nishizuka, 1986), можно предположить, что отсутствие продуктов 5-липоксигеназного пути окисления АК при активации ПКС связано с неадекватным Ca^{2+} -сигналом (Tripp et al., 1985b).

В перитонеальных макрофагах мыши окислительный метаболизм АК активируется при действии противоопухолевого агента циклофосамида (циклофосфана, эндоксана) (Giordano et al., 1988). Циклофосамид увеличивает освобождение продуктов циклооксигеназного (простагландин E_2) и липоксигеназного (лейкотриен C_4) путей окисления АК. Полагают, что этот эффект циклофосамида определяет его иммуномодулирующее действие (Giordano et al., 1988).

В макрофагоподобной клеточной линии P388D₁ основными продуктами циклооксигеназного пути окисления АК (индуцированного липополисахаридом из *E.coli*, фактором активации тромбоцитов, мелиттином или Ca^{2+} -ионофором A23187) являются простагландин D_2 и простагландин E_2 (Lister et al., 1989; Glaser et al., 1990; Barbour, Dennis,

1993). Обнаружено, что в этих процессах участвует внеклеточная фосфолипаза А₂ II группы (Barbour, Dennis, 1993).

В перитонеальных макрофагах крысы метаболизм АК активируется при действии препарата ОК-432, полученного из *Streptococcus pyogenes* (Watanabe et al., 1992). Этот препарат является иммуностимулятором и эффективным противоопухолевым агентом. Показано, что в макрофагах ОК-432 стимулирует продукцию простагландина Е₂ дозозависимым образом. Стимулирующий эффект ОК-432 на метаболизм АК подавляется ингибитором фагоцитоза цитохалазином В. Однако ОК-432 не активирует клетки MDCK, не имеющие фагоцитарной активности. Это свидетельствует о том, что вызванная ОК-432 активация метаболизма АК связана, по-видимому, с фагоцитозом частиц ОК-432 (Watanabe et al., 1992).

Представляют интерес данные о том, что ответы культивируемых мононуклеарных фагоцитов на приложение различных воспалительных стимулов зависят от того, в каких условиях *in vivo* эти клетки находились. Так, обнаружено, что резидентные перитонеальные макрофаги мыши при стимуляции их зимозаном продуцируют большие количества продуктов циклооксигеназного пути окисления АК простагландина Е₂ и 6-кетопростагландина F_{1α} (Humes et al., 1980). В то же время, перитонеальные макрофаги, полученные из мышей, которым предварительно делались интраперитонеальные инъекции воспалительного стимула, такого как тигликолат, продуцировали значительно меньшие количества простагландина Е₂ и 6-кетопростагландина F_{1α} при воздействии зимозана. Обнаружено, что эти различия между резидентными и активированными тигликолатом популяциями макрофагов могут быть обусловлены тем, что активированные макрофаги освобождают существенно меньшие количества АК в ответ на приложение зимозана по сравнению с резидентными клетками (Humes et al., 1980).

Клетки мононуклеарного ряда, моноциты и макрофаги, способны образовывать лейкотриены наряду с другими биологически активными молекулами, такими как простагландины, интерлейкин-1, фактор некроза опухолей и др. (Hamilton, Adams, 1987; Lavolette et al., 1988). Несмотря на то, что моноциты периферической крови, альвеолярные макрофаги и перитонеальные макрофаги имеют общего предшественника и выполняют сходные роли, они находятся *in vivo* в различном окружении и имеют в связи с этим морфологические и функциональные различия, включая различия в метаболизме АК. В перитонеальных макрофагах человека ионофор А 23187 или экзогенная АК стимулируют 5-липоксигеназный путь окисления АК с образованием 5-гидроксиэйкозатетраеновой кислоты, лейкотриена В₄ и лейкотриена С₄ (Lavolette et al., 1988). Этот профиль продуктов липоксигеназного пути окисления АК для

перитонеальных макрофагов сходен с таковым для моноцитов периферической крови человека, стимулированных ионофором A23187. В то же время, альвеолярные макрофаги, активированные A 23187, продуцируют только 5-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту и лейкотриен В₄, но не лейкотриены С₄, D₄ или Е₄.

Как отмечалось ранее, характер метаболических превращений АК в большой степени зависит от типа используемого стимула. В работе Брауна и др. (Brown et al., 1988) исследована возможность избирательной стимуляции циклооксигеназного или липоксигеназного путей окисления АК в альвеолярных макрофагах человека. Обнаружено, что липополисахарид из *E. coli* избирательно стимулирует циклооксигеназный путь окисления АК: продуцируются простагландины D₂, E₂, F_{2α}, тромбоксан В₂ и гидроксигептадекатриеновая кислота. Продукты липоксигеназного пути окисления АК не были идентифицированы, даже в присутствии ингибиторов циклооксигеназы (индометацин). Напротив, Са²⁺-ионофор A 23187 избирательно стимулирует липоксигеназный путь окисления АК в альвеолярных макрофагах человека, при этом образуются метаболиты 5-липоксигеназы лейкотриен В₄ и 5-гидроксиэйкозатетраеновая кислота. Продукты циклооксигеназного пути окисления АК при этом не были идентифицированы, даже в присутствии ингибиторов липоксигеназ (нордигидрогуаретиковая кислота). Эти данные свидетельствуют о том, что в альвеолярных макрофагах человека можно избирательно стимулировать липоксигеназный или циклооксигеназный пути окисления АК (Brown et al., 1988). Сходные данные получены ранее на перитонеальных макрофагах мыши (Scott et al., 1980; Humes et al., 1982). В присутствии ингибиторов одного из путей, не наблюдается переключения на альтернативный путь окисления АК.

В последнее время внимание исследователей привлекает не только АК, но и другие ЖК, не являющиеся субстратом для циклооксигеназ и липоксигеназ.

4.3.4. Жирные кислоты и модуляция активности ионных каналов

АК и другие ЖК являются важными структурными компонентами мембранных липидов. В настоящее время известно более 200 жирных кислот, отличающихся по длине углеводородной цепи, степени и характеру ее разветвления, числу и положению двойных связей, природе и количеству других функциональных групп. ЖК, входящие в состав фосфо- и гликолипидов мембран эукариот, содержат от 12 до 24 атомов углерода. Подавляющее большинство ЖК имеет, как правило, четное

число атомов углерода; кислоты с нечетным числом атомов углерода входят только в состав ганглиозидов и цереброзидов (Марри и др., 1993).

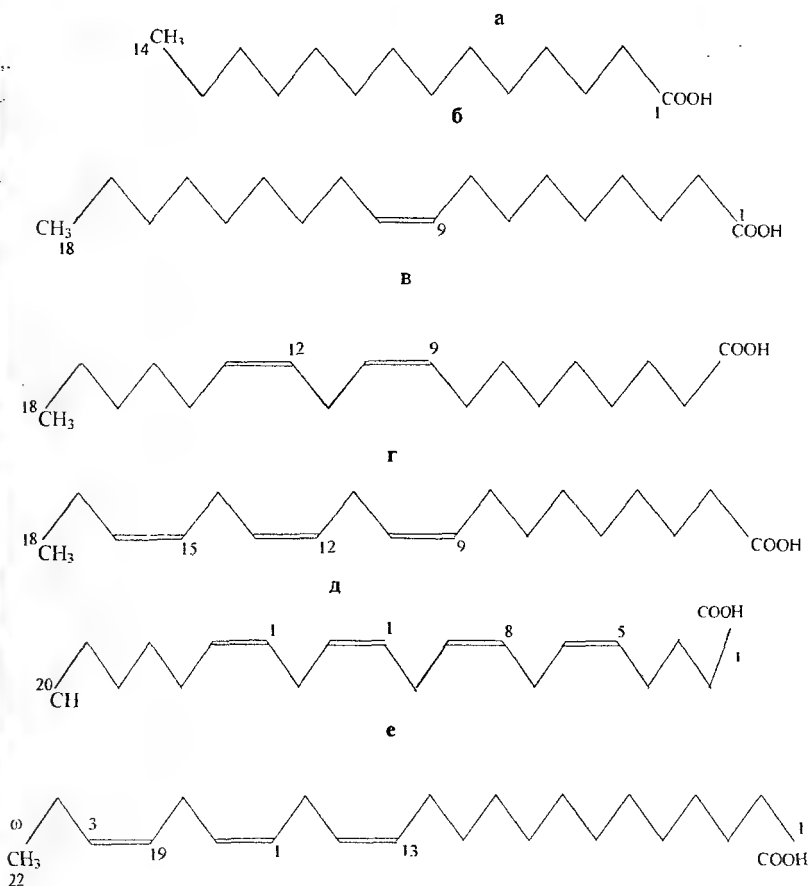


Рис. 16. Структура жирных кислот

а - миристиновая кислота (14:0); б - олеиновая кислота (ω 9, 18:1, Δ^9); в - линолевая кислота (ω 6, 18:2, $\Delta^{9,12}$); г - α -линоленовая кислота (ω 3, 18:3, $\Delta^{9,12,15}$); д - арахидоновая кислота (ω 6, 20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$); е - докозатриеновая кислота (ω 3, 22:3, $\Delta^{13,16,19}$).

ЖК могут быть насыщенными (не содержащими двойных связей) и ненасыщенными (содержащими одну или более двойных связей). Насыщенные ЖК имеют длинную неразветвленную цепь; их общая формула $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$. В мембранах клеток животных наиболее часто встречаются насыщенные ЖК с 14, 16 и 18 углеродными атомами: миристиновая (14:0) (рис. 16), пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0) кислоты (Марри и др., 1993).

Ненасыщенные ЖК подразделяют в соответствии со степенью ненасыщенности на мононенасыщенные (моноеновые, одна двойная связь) и полиненасыщенные (полиеновые, несколько двойных связей) кислоты. Цис-двойная связь в моноеновых ЖК находится, как правило, между 9-м и 10-м атомами углерода (реже между 11-м и 12-м). Обычно ненасыщенные цепи присоединяются ко второму атому углерода остатка глицерина глицерофосфолипидов мембран. Общее же число двойных связей может достигать шести (гексаеновые кислоты). Все двойные связи в ненасыщенных ЖК, обычно встречающихся в тканях млекопитающих, имеют цис-конформацию (Марри и др., 1993).

Атомы углерода в молекуле ЖК нумеруются, начиная от карбоксильной группы. Атом углерода, следующий за карбоксильной группой (углерод 2), называют также α -углеродом. Атом углерода 3 – это β - углерод, а углерод концевой метильной группы (углерод n) - ω -углерод. Для указания числа двойных связей и их положения были приняты различные соглашения, например Δ^9 означает, что двойная связь в молекуле жирной кислоты находится между атомами углерода 9 и 10, считая от карбоксильного конца; $\omega 9$ – двойная связь находится у девятого атома углерода, считая от концевой метильной группы. В ЖК животных организмов в процессе метаболизма могут вводиться дополнительные двойные связи, но всегда между уже имеющейся двойной связью (например $\omega 9$, $\omega 6$ или $\omega 3$) и карбоксильным углеродом; это приводит к разделению ЖК на 3 семейства животного происхождения - $\omega 3$, $\omega 6$ или $\omega 9$ (Марри и др., 1993).

Основную долю ненасыщенных ЖК в липидах мембран животных клеток составляют олеиновая ($\omega 9$, 18:1, Δ^9), линолевая ($\omega 6$, 18:2, $\Delta^{9, 12}$), α -линоленовая ($\omega 3$, 18:3, $\Delta^{9, 12, 15}$), арахидоновая ($\omega 6$, 20:4, $\Delta^{5, 8, 11, 14}$), докозатриеновая ($\omega 3$, 22:3, $\Delta^{13, 16, 19}$) кислоты (рис. 16). АК (эйкозатетраеновая кислота) является цис-полиненасыщенной ЖК, содержит 20 атомов углерода; четыре двойные связи расположены у 5, 8, 11 и 14 атомов углерода, считая от карбоксильного конца; относится к семейству $\omega 6$. Арахидоновая, линолевая и α -линоленовая кислоты называются незаменимыми ЖК, необходимыми для полноценного питания многих видов животных и человека (Марри и др., 1993).

Свободные или неэстерифицированные ЖК освобождаются из фосфолипидов мембран в результате рецепторзависимой или рецепторнезависимой активации фосфолипаз. Экзогенные ЖК могут также доставляться к клеткам, будучи связанными с альбумином и липопротеинами сыворотки крови. Именно свободные ЖК могут играть роль первичных или вторичных посредников, непосредственно модулирующих активность различных эффекторов в клетке, в первую очередь ионных каналов (Ordway et al., 1991; Meves, 1994; Крутецкая, Лебедев, 1995, 2000а).

Регуляция активности ионных каналов непосредственно ЖК показана для разных типов ионных каналов в различных объектах (см обзоры: Ordway et al., 1991; Meves, 1994; Крутецкая, Лебедев, 1995, 2000а). Мишенями для ЖК являются: потенциал-зависимые K^+ -, Na^+ - Ca^{2+} -каналы, Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы, лиганд-управляемые каналы NMDA- и ацетилхолиновых рецепторов, IP_3 -чувствительные каналы Ca^{2+} -выброса, Cl^- -каналы, каналы щелевых контактов. Эффективными модуляторами активности ионных каналов оказались представители цис-полиненасыщенных, транс-полиненасыщенных, цис-мононенасыщенных и насыщенных ЖК. Предполагают, что активные ЖК должны быть настолько гидрофильными, чтобы достигать эффективной концентрации в водном растворе, и вместе с тем настолько гидрофобными, чтобы взаимодействовать с гидрофобным участком белка или липида.

Примером прямой модуляции активности ионных каналов ЖК является влияние АК и других ЖК на потенциал-зависимые K^+ -каналы в перитонеальных макрофагах крысы.

В последние годы в режиме локальной фиксации потенциала в конфигурации "whole-cell" нами показано, что активность K^+ -каналов выходящего выпрямления в мембране перитонеальных макрофагов крысы модулируется свободными ЖК (Крутецкая и др., 1995а, 1995б; Krutetskaya et al., 1994; Крутецкая, Лебедев, 1998). Обнаружено, что внесклеточные цис-полиненасыщенные (арахидоновая, $C_{20:4}$; докозатриеновая, $C_{22:3}$; линолевая, $C_{18:2}$), цис-мононенасыщенные (олеиновая, $C_{18:1}$) и насыщенные (миристиновая, $C_{14:0}$) ЖК в концентрации 10-50 мкМ вызывают дозо-зависимое уменьшение пиковой амплитуды и ускорение кинетики активации и инактивации K^+ -токов в широкой области мембранных потенциалов. Эффект ЖК обратим при добавлении в наружную среду 0,1% альбумина (который имеет связывающие участки для ЖК). Выявлена корреляция между числом двойных связей в молекуле кислоты (степенью ненасыщенности) и ее эффективностью. Наиболее эффективными модуляторами активности K^+ -каналов оказались полиненасыщенные ЖК: АК, докозатриеновая, линолевая. Предварительная инкубация макрофагов с ингибитором циклооксигеназ индометацином (10 мкМ) или ингибитором липоксигеназ

нордигидрогуаретиковой кислотой (10 мкМ) не предотвращает эффект арахидоновой и докозатриеновой кислот (Крутецкая и др., 1995а, 1995б; Krutetskaya et al., 1994; Крутецкая, Лебедев, 1998). Ингибитор фосфолипазы A_2 и освобождения ЖК 4-бромфенилбромид (10-50 мкМ), наоборот, вызывает дозо-зависимое увеличение амплитуды K^+ -токов при всех значениях мембранного потенциала (Крутецкая и др., 1994; Krutetskaya et al., 1994).

Наиболее выраженным эффектом АК и других ЖК на K^+ -каналы в перитонеальных макрофагах и других объектах является существенное ускорение кинетики инактивации токов. Одним из возможных механизмов ускорения спада токов при действии различных агентов является предпочтительное блокирование открытых каналов. Такой механизм ускорения кинетики инактивации потенциал-зависимых K^+ -токов под действием четвертичных ионов аммония был предложен в классических работах Армстронга (см. Hille, 1992, 2001) на мембране гигантского аксона кальмара. Другим вероятным механизмом ускорения спада токов может быть специфическое влияние агентов на инактивационную фазу K^+ -токов (Rouzai-Dubois et al., 1991). Полученные данные позволяют предположить прямое влияние АК и других ЖК на K^+ -каналы в мембране перитонеальных макрофагов крысы.

4.4. Тирозинкиназы и тирозинфосфатазы

Несмотря на то, что фосфорилирование белков по остаткам тирозина является более редким событием по сравнению с фосфорилированием по остаткам серина или треонина, установлено, что фосфорилирование по тирозину играет ключевую роль во многих клеточных процессах, таких как пролиферация, рост и дифференцировка (Glennay, 1992; Schlessinger, Ullrich, 1992). Процессы фосфорилирования/дефосфорилирования остатков тирозина являются общим элементом путей внутриклеточной сигнализации, запускаемых различными агентами, такими как ростовые факторы (Schlessinger, Ullrich, 1992), цитокины (Chiba et al., 1993; Ihle, 1996), нейротрансмиттеры (Bading, Greenberg, 1991). Можно выделить 2 типа тирозинкиназ и тирозинфосфатаз: рецепторные и цитоплазматические (Fischer et al., 1991; Hunter, 1995, 1996; Tonks, Neel, 1996). Рецепторные тирозинкиназы связаны с рецепторами ростовых факторов (эпидермального фактора роста, инсулиноподобного фактора роста, фактора роста тромбоцитов и др. (Cadena, Gill, 1992; Ullrich, Schlessinger, 1990). Наиболее изученными цитоплазматическими тирозинкиназами являются тирозинкиназы семейства Src, являющиеся продуктами

онкогена вируса саркомы Payca (Erpel, Courtneidge, 1995; Superti-Furga, 1995; Superti-Furga, Courtneidge, 1995).

4.4.1. Рецепторы с тирозинкиназной активностью

Фосфорилирование белков по остаткам тирозина составляет менее 0,01 % от общих процессов фосфорилирования в клетке. Фосфорилирование тирозина происходит практически исключительно у многоклеточных и отсутствует у одноклеточных эукариот. Таким образом, фосфорилирование тирозина может рассматриваться как показатель передачи сигналов у многоклеточных организмов (Ullrich, Schlessinger, 1990). Рецепторные тирозинкиназы участвуют в трансмембранной передаче сигналов, в то время как внутриклеточные тирозинкиназы принимают участие в процессах сигнализации в клетке, включая передачу информации в ядро.

Общая характеристика рецепторных тирозинкиназ. Тирозинкиназные рецепторы, играющие ведущую роль в процессах роста, развития и дифференцировки клеток, имеют общий план строения и состоят из четырех основных доменов (Cadena, Gill, 1992; Hunter, 1996). Экстраклеточный домен участвует в связывании лиганда и получении внешнего сигнала. Связывание агониста вызывает конформационные изменения, которые активируют цитоплазматический тирозинкиназный домен (290 аминокислот). Этот домен определяет биологический ответ и передает сигнал внутрь клетки. Трансмембранный домен соединяет вне- и внутриклеточные фрагменты и один раз пронизывает мембрану. Различные рецепторы содержат один или более регуляторных доменов, представленных терминальным COOH-участком или дополнительным киназным фрагментом. На регуляторных доменах расположены множественные участки аутофосфорилирования рецепторов.

На основании сходства структурных элементов в настоящее время выделяют 14 различных семейств рецепторных тирозинкиназ (Heldin, 1995; Hunter, 1996). Различие между семействами наиболее ярко проявляется в структуре их экстраклеточных доменов. Так, семейство рецепторов эпидермального фактора роста (ЭФР) содержит во внеклеточной области 2-3 участка, богатых цистеином. Семейство, включающее рецепторы инсулина и инсулиноподобного фактора роста, представляет собой связанные дисульфидными связями гетеротетрамеры из 2α - и 2β -субъединиц. В экстраклеточной области этих рецепторов выявлен один участок, богатый цистеином. Рецептор фактора роста гепатоцитов существует в виде гетеродимера из α - и β -субъединиц и также содержит один богатый цистеином участок во внеклеточной области.

Для другой большой группы рецепторов характерно наличие иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области и дополнительного регуляторного участка в тирозинкиназном домене. Так, семейство рецепторов фактора роста тромбоцитов содержит 5, а семейство рецепторов фактора роста фибробластов – 3 иммуноглобулиноподобных доменов. Семейство рецепторов фактора роста нервов содержит во внеклеточной области 2 иммуноглобулиноподобных домена и участки, богатые лейцином (Hunter, 1996).

Вышеописанные семейства рецепторов относятся к классу трансмембранных рецепторных тирозинкиназ. В последнее время идентифицирована особая группа рецепторов, передающих информацию с участием тирозинкиназы. Эти рецепторы не имеют собственного каталитического тирозинкиназного домена, но при активации связываются с цитоплазматическими тирозинкиназами и образуют сигнальный комплекс. К этой группе рецепторов, которые часто называют бимолекулярные рецепторные тирозинкиназы, относятся рецепторы цитокинов, рецепторы антигенов на Т- и В-лимфоцитах, а также F_c -рецепторы. В качестве сигнальных субъединиц для этих рецепторов выступают нерецепторные тирозинкиназы семейства Src и Jak (Hunter, 1996).

Функциональный ответ рецепторов факторов роста определяется их тирозинкиназной активностью. Мутации, устраняющие тирозинкиназную активность, подавляют также биологическую функцию рецептора. Важность каталитического киназного домена подтверждается высокой степенью консерватизма структуры рецепторных тирозинкиназ, цитоплазматических тирозинкиназ и протеинкиназ, фосфорилирующих белки по остаткам серина и треонина (Cadena, Gill, 1992).

Механизм, посредством которого связывание лиганда приводит к активации тирозинкиназы, далек от полного понимания. Наибольшее распространение получила межмолекулярная модель, в соответствии с которой связывание факторов роста вызывает олигомеризацию (димеризацию) рецепторов и активацию тирозинкиназы. Таким образом, димеризация рецепторов является необходимой для полной активации тирозинкиназы (Ullrich, Schlessinger, 1990; Schlessinger, Ullrich, 1992; Heldin, 1995).

Активированные рецепторные тирозинкиназы передают информацию путем фосфорилирования белков и путем белок-белковых взаимодействий. После связывания лиганда происходит быстрое аутофосфорилирование С-терминальных остатков тирозина на молекуле рецептора. В результате аутофосфорилирования удаляются конкурентные вещества, создаются условия для фосфорилирования экзогенных субстратов, образуются участки для связывания белков, содержащих SH_2 -

и SH₃-домены (Schlessinger, Ullrich, 1992; Schlessinger, 1994; Pawson, 1994, 1995; Marshall, 1995).

SH₂- и SH₃-домены представляют собой малые белковые модули, которые опосредуют белок-белковые взаимодействия в сигнальных путях, активируемых тирозинкиназами (Schlessinger, 1994; Pawson, 1994, 1995; Hunter, 1996). SH₂- и SH₃-домены входят в состав многих белков, участвующих в процессах внутриклеточной сигнализации. Два домена часто обнаруживаются вместе в одном и том же белке. Однако, некоторые белки содержат один SH₂- или SH₃-домен, в то время как другие белки содержат несколько копий каждого домена. Локализация SH₂- и SH₃-доменов в белке также варьирует.

Выделяют две основные группы белков, содержащих SH₂- и SH₃-домены. К первой группе относятся белки, имеющие известную энзиматическую активность: цитоплазматические тирозинкиназы семейства Src, Abl, Csk (SH₂-домен, SH₃-домен); ФЛСγ (два SH₂-домена, SH₃-домен); GAP120-белок, активирующий ГТФазу Ras белка (SH₂-домен, SH₃-домен); тирозинфосфатазы PTP1C (два SH₂-домена) и PTP1D (SH-PTP2/SYP) (два SH₂-домена); регуляторная субъединица p85 фосфатидилинозитол-3-киназы (два SH₂-домена, SH₃-домен). Ко второй группе относятся адапторные белки, состоящие исключительно из SH₂- и SH₃-доменов: белок Shc (SH₂-домен); белок Nck (SH₂-домен, три SH₃-домена); белок Crk (SH₂-домен, два SH₃-домена); белок Grb2 (growth-factor-receptor-binding protein), связывающийся с рецепторами ростовых факторов (SH₂-домен, два SH₃-домена); субъединица p85 фосфатидилинозитол-3-киназы (Pawson, 1994, 1995; Schlessinger, 1994). В качестве субстратов для тирозинкиназ могут также выступать структурные белки, такие как аннексин I и аннексин II, эзрин, винкулин, талин, тензин, паксиллин, кавеолин (Hunter, 1996).

Так, регуляторный COOH-домен рецептора ЭФР содержит по меньшей мере 5 остатков тирозина, которые подвергаются аутофосфорилированию. С фосфорилированным регуляторным доменом рецептора ЭФР связываются GAP-белок Ras белка, ФЛСγ, белок Grb2 и белок Shc. Основным участком связывания для ФЛСγ является Tyr-992, в то время как Grb2 и Shc взаимодействуют с Tyr-1068 и Tyr-1173, соответственно. Интересно, что белок Shc может фосфорилироваться по Tyr-317, который служит связывающим участком для SH₂-домена Grb2 белка (Schlessinger, 1994; Boonstra et al., 1995).

В мембране образуются гетеромерные комплексы, состоящие из аутофосфорилированного рецептора и белков, содержащих SH₂- и SH₃-домены. В результате происходит фосфорилирование белков по остаткам тирозина (Schlessinger, Ullrich, 1992; Schlessinger, 1994; Pawson, 1994, 1995; Marshall, 1995). Информация передается в клетку путем фосфорилирования связанных белков, а также других субстратов,

включающих протеинкиназы, специфичные к остаткам серина и треонина. Рецепторы с тирозинкиназной активностью играют важнейшую роль в процессах роста и дифференцировки клеток. Мутации, нарушающие регуляцию тирозинкиназы, приводят к неконтролируемому делению и трансформации клеток.

Рецептор гормона инсулина. Рецептор инсулина относится к суперсемейству рецепторов, имеющих собственную тирозинкиназную активность (Ullrich, Schlessinger, 1990; Cadena, Gill, 1992; Hunter, 1995, 1996; Saltiel, 1996). К семейству инсулинового рецептора относятся также рецепторы инсулиноподобного фактора роста-1 (insulin-like growth factor-1) и инсулин-связанные рецепторы (insulin-related receptors), агонисты которых в настоящее время не идентифицированы (Fantl et al., 1993). Рецептор инсулина представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух α - и двух β -субъединиц (рис. 17). Связывающая гормон экстраклеточная α -субъединица связана дисульфидной связью с трансмембранной β -субъединицей, содержащей цитоплазматический тирозинкиназный домен. В экстраклеточной области рецептора содержатся участки, богатые цистеином. После связывания инсулина происходит быстрое аутофосфорилирование β -субъединиц рецептора по нескольким специфическим остаткам тирозина и активация тирозинкиназной активности. По мнению ряда авторов, связывание инсулина приводит к тому, что каждая β -субъединица фосфорилирует себя путем внутримолекулярной цис-реакции (Saltiel, 1996; White, 1996).

Другие работы свидетельствуют о том, что фосфорилирование β -субъединиц происходит по механизму межмолекулярного трансфосфорилирования (White, 1996). Основные участки тирозинового фосфорилирования сосредоточены в двух областях β -субъединицы: С-терминальном домене (Tyr-1316 и Tyr-1322) и области, окружающей Tyr-1146, Tyr-1150, Tyr-1151 (Fantl et al., 1993; White, Kahn, 1994). После связывания инсулина происходит аутофосфорилирование Tyr-1150, необходимое для активации рецептора. Далее наблюдается фосфорилирование Tyr-1151 и Tyr-1146 (Levine et al., 1991; Walton, Dixon, 1993). Остаток тирозина (Tyr-960) в цитоплазматическом домене рецептора, ближайшем к трансмембранному сегменту, является важным для опосредования биологической активности инсулина (White et al., 1988; Ullrich, Schlessinger, 1990). В результате аутофосфорилирования рецепторов с собственной тирозинкиназной активностью создаются условия для фосфорилирования по остаткам тирозина эндогенных субстратов, образуются участки для связывания белков, содержащих SH₂- и SH₃-домены (Cadena, Gill, 1992). Аутофосфорилированный инсулиновый рецептор фосфорилирует по остаткам тирозина такие эндогенные субстраты, как субстрат инсулинового рецептора-1 (insulin receptor substrate, IRS-1); белок Shc, содержащий SH₂-домен; различные

белки с мол. массой 60 кДа, один из которых тесно связан с GAP-белком Ras-белка (White, Kahn, 1994; Danielsen et al., 1995; White, 1996).

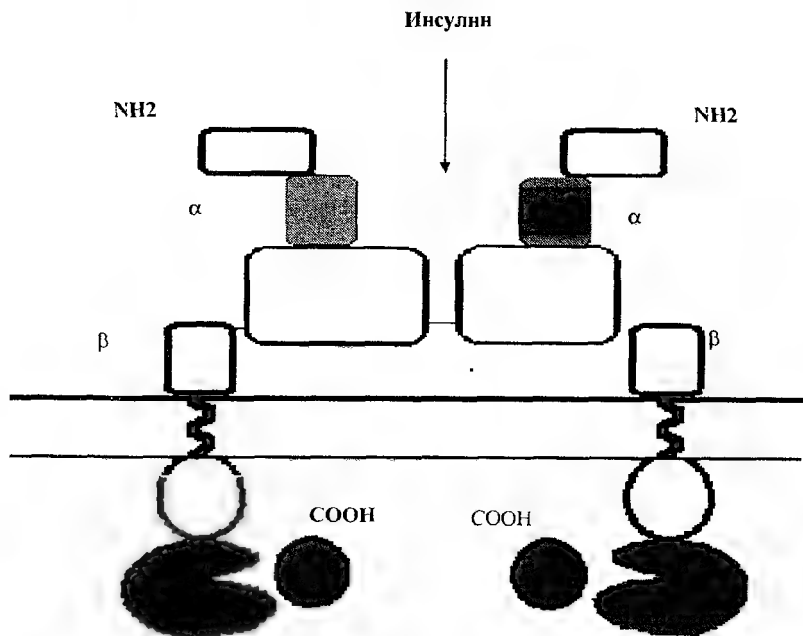


Рис. 17. Структура рецептора инсулина.

α , β - субъединицы рецептора.

■ - участки, богатые цистеином.

● - тирозинкиназный домен.

● - С-терминальный регуляторный участок.

IRS-1 является ключевой сигнальной молекулой для инсулинового рецептора. IRS-1 представляет собой белок с мол. массой 185 кДа и содержит более 10 потенциальных участков фосфорилирования по тирозину (White, 1996). Фосфорилированный IRS-1 связывается с белками, содержащими SH₂-домен, такими как фосфатидилинозитол-3-киназа; тирозинфосфатаза SH-PTP2 или PTP1D; белок Grb2; белок Nck (White, Kahn, 1994; Danielsen et al., 1995; Malarkey et al., 1995; White, 1996).

В последнее время появились данные о том, что рецептор инсулина может взаимодействовать с гетеротримерными G_i- и G_s-белками. В тирозинкиназном домене рецептора инсулина идентифицирован фрагмент (аминокислоты 1135-1156), с которым связываются G-белки. Этот фрагмент содержит 3 остатка тирозина, которые подвергаются аутофосфорилированию. На адипоцитах крысы обнаружено, что инсулин стимулирует связывание G_i-белка (с мол. массой 41 кДа) с рецептором инсулина (Jo et al., 1993).

Кроме того, накапливается все больше данных о важной роли актиновых филаментов в распространении сигналов, запускаемых связыванием инсулина со своим рецептором в мембране (Tsakiridis et al., 1997).

Дефосфорилирование аутофосфорилированных рецепторов ростовых факторов белковыми тирозинфосфатазами является, по-видимому, основным механизмом отрицательной регуляции активности рецепторов с тирозинкиназной активностью (Tomic et al., 1995). Наиболее возможными кандидатами для физического взаимодействия с аутофосфорилированными рецепторами ростовых факторов являются тирозинфосфатазы, имеющие SH₂-домен. Идентифицированы две фосфотирозинфосфатазы, имеющие SH₂-домен: PTP1C (SH-PTP1) и PTP1D (SH-PTP2). В опытах *in vitro* показано, что тирозинфосфатаза PTP1D взаимодействует с инсулиновым рецептором и IRS-1. Связывание рецептора с PTP1D приводит к тирозиновому фосфорилированию фосфатазы и активации ее тирозинфосфатазной активности (Vogel et al., 1993). Установлено также, что совместная экспрессия фосфатазы PTP1C с инсулиновым рецептором или рецептором инсулиноподобного фактора роста-1 приводит к их полному или частичному дефосфорилированию (Vogel et al., 1993). Кроме того, обнаружено, что тирозинфосфатаза PTP1B, не содержащая SH₂-домена, также подавляет активность инсулинового рецептора (Fischer et al., 1991).

Рецептор фактора роста тромбоцитов. (ФРТ) относится к семейству рецепторных тирозинкиназ; для него характерно наличие пяти иммуноглобулиноподобных доменов во внеклеточной области и дополнительного регуляторного участка в тирозинкиназном домене (рис. 18).

Рецептор ФРТ

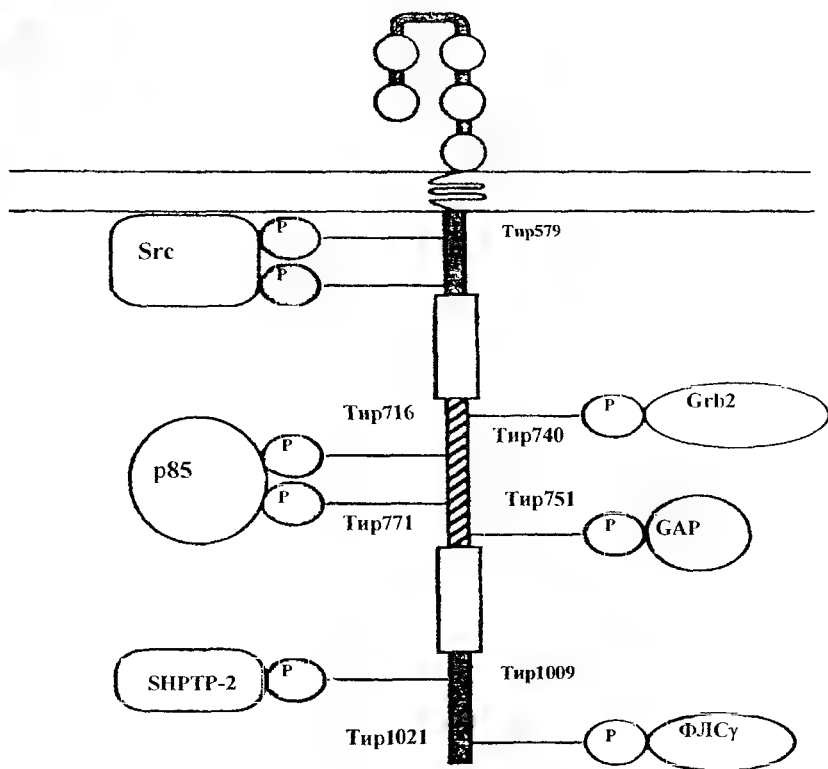


Рис. 18. Структура рецептора для фактора роста тромбоцитов (ФРТ), относящегося к рецепторным тирозинкиназам.

Фосфорилированный рецептор ФРТ может взаимодействовать со следующими белками-мишенями: src-цитоплазматическими тирозинкиназами семейства src; ФЛСγ - фосфолипазой Cγ; p85 - субъединицей 85 кДа фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИ-3К); GAP - ГТФаза-активирующим белком; Grb2 - белком 2, связывающимся с рецепторами ростовых факторов (growth-factor-receptor binding proteins); SHPTP-2 - фосфотирозинфосфатазой (по Malarkey et al., 1995).

Рецептор ФРТ содержит по меньшей мере 8 остатков тирозина, которые подвергаются аутофосфорилированию при активации рецептора. Эти участки аутофосфорилирования распределены по всему цитоплазматическому домену рецептора. Так, фосфорилирование Tyr-579 и Tyr-581 необходимо для связывания тирозинкиназ семейства Src, в то время как субъединица p85 фосфатидилинозитол-3-киназы взаимодействует с фосфорилированными остатками Tyr-740 и Tyr-751 в киназном вставочном домене. Tyr-751 служит также связывающим участком для белка Nck. GAP-белок Ras белка взаимодействует с Tyr-771, тирозинфосфатаза PTP1D (SH-PTP-2) связывается с Tyr-1009, а ФЛСγ связывается с Tyr-1021. Белок Grb2 взаимодействует с фосфорилированным остатком тирозина на молекуле тирозинфосфатазы SH-PTP-2. Кроме того, белок Grb2 может прямо связываться с фосфорилированным Tyr-716 в киназном вставочном домене (Pawson, 1994; Schlessinger, 1994; Malarkey et al., 1995).

К семейству рецепторов ФРТ относится рецептор фактора стимуляции колоний (CSF-1, colony-stimulating factor 1), который обычно экспрессирован в макрофагах и фибробластах (Hunter, 1996). Основными участками аутофосфорилирования являются Tyr-697, Tyr-706 и Tyr-721, локализованные в киназном вставочном домене рецептора. Фосфорилированный остаток Tyr-721 связывается с регуляторной субъединицей p85 фосфатидилинозитол-3-киназы, а Tyr-697 взаимодействует с белком Grb2. Обнаружено, что активированный рецептор CSF-1 взаимодействует также с тирозинкиназами семейства Src, что приводит к их активации (Courtneidge et al., 1993; Erpel, Courtneidge, 1995; Hunter, 1996). Тирозинкиназы семейства Src взаимодействуют в основном с фосфорилированным остатком Tyr-561, расположенным в ближайшем к мембране домене рецептора CSF-1 (Alonso et al., 1995; Erpel, Courtneidge, 1995).

4.4.2. Нерепцепторные тирозинкиназы

Нерепцепторные тирозинкиназы представляют собой белки, которые не пронизывают мембрану, хотя многие из них, подобно тирозинкиназам семейства Src, связаны с клеточными мембранами. Большинство нерепцепторных тирозинкиназ локализованы в цитоплазме, однако некоторые из них расположены также и в ядре. В настоящее время выделяют следующие семейства нерепцепторных тирозинкиназ: Abl (2 члена), Fes/Fps (2 члена), Syk/Zap 70 (2 члена), Jak (4 члена), Btk (5 членов), Fak (2 члена), Ack (1 член), Src (9 членов), Csk (2 члена) (Superti-Furga, Courtneidge, 1995; Hunter, 1996). Тирозинкиназы семейств Abl, Btk,

Src, Csk, кроме высоко консервативного каталитического домена, содержат SH_2 - и SH_3 -домены. Многие нерецепторные тирозинкиназы играют важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации. Так, тирозинкиназы семейств Src, Jak и Fak прямо участвуют в процессах трансмембранной передачи сигнала и выступают в роли каталитических субъединиц мембранных рецепторов, не имеющих собственной тирозинкиназной активности (Hawley, 1995).

Наиболее изучены нерецепторные тирозинкиназы семейства Src. У млекопитающих и птиц насчитывают 9 представителей этого семейства: Src, Fyn, Yes, Lyn, Hck, Fgr, Lck, Blk, Yrk (Erpel, Courtneidge, 1995; Superti-Furga, 1995; Superti-Furga, Courtneidge, 1995). Тирозинкиназы семейства Src имеют сходное строение и состоят из идентичных структурных и функциональных доменов (рис. 19) (Fincham et al., 1994; Superti-Furga, 1995).

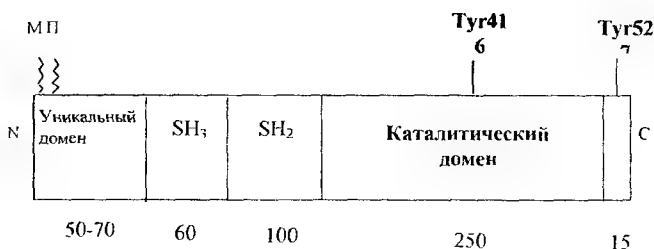


Рис. 19. Структурные и функциональные домены цитоплазматических тирозинкиназ семейства src.

Цифрами указано число аминокислот, образующих различные домены тирозинкиназ. Показаны также участки миристоилирования (М, глицин-2), пальмитоилирования (П, остатки цистеина, входящие в состав первых десяти аминокислот), а также два основных регуляторных участка фосфорилирования (Тир 416 и Тир 527) (по Superti-Furga, 1995).

Все представители семейства Src связаны с мембранами. Первые 15 аминокислот с N-конца молекулы тирозинкиназы включают участки миристоилирования и пальмитоилирования (Buser et al., 1994; Resh, 1994).

Ацилирование жирными кислотами необходимо для связывания тирозинкиназ с мембраной. Миристиновая кислота ($C_{14:0}$) связывается с глицином в положении 2, в то время как пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$) взаимодействует с остатками цистеина, входящими в состав первых десяти аминокислот. Миристоилирование предшествует пальмитоилированию, т.к. белки, не содержащие глицина в положении 2, не подвергаются пальмитоилированию. Первые 15 аминокислот с N-конца молекулы тирозинкиназы Src включают также много основных аминокислот, которые взаимодействуют электростатически с отрицательно заряженными фосфолипидами (Resh, 1994). За аминокислотным фрагментом, связывающимся с жирными кислотами, следует уникальный домен (40-70 аминокислот), различающийся у разных представителей семейства Src, который участвует во взаимодействии с другими белками. Далее расположены SH_3 -домен (60 аминокислот), SH_2 -домен (100 аминокислот) и каталитический домен (250 аминокислот). В каталитическом домене идентифицированы два функционально важных участка: Lys-295, связывающийся с АТФ, и Tyr-416, фосфорилирование которого необходимо для каталитической активности тирозинкиназы. За каталитическим доменом следует С-терминальный регуляторный домен (15-20 аминокислот). В регуляторном домене выявлен консервативный остаток Tyr-527, играющий важную роль в регуляции активности тирозинкиназ семейства Src (Fincham et al., 1994; Superti-Furga, 1995; Superti-Furga, Courtneidge, 1995).

Обнаружено, что активность всех представителей семейства Src ингибируется при фосфорилировании Tyr-527, расположенного в С-терминальном регуляторном домене. После фосфорилирования Tyr-527 и дефосфорилирования Tyr-416 происходит изменение конформации молекулы из активной в неактивную (рис. 20). При этом фосфорилированный Tyr-527 взаимодействует с SH_2 -доменом, а SH_3 -домен взаимодействует с участком каталитического домена. Стимуляция каталитической активности тирозинкиназы происходит после аутофосфорилирования Tyr-416 и дефосфорилирования Tyr-527 на С-конце с последующим изменением конформации молекулы из неактивной в активную (Malarkey et al., 1995; Superti-Furga, 1995; Superti-Furga, Courtneidge, 1995).

Шесть представителей тирозинкиназ семейства Src (Lck, Lyn, Fyn, Hck, Fgr, Blk) экспрессированы в гемопоэтических клетках и участвуют в передаче сигналов в лимфоцитах, моноцитах и гранулоцитах (Bolen, Brugge, 1997).

Тирозинкиназы семейства Src играют ключевую роль во многих внутриклеточных процессах, таких как рост и дифференцировка клеток, реорганизация цитоскелета (Erpel, Courtneidge, 1995).

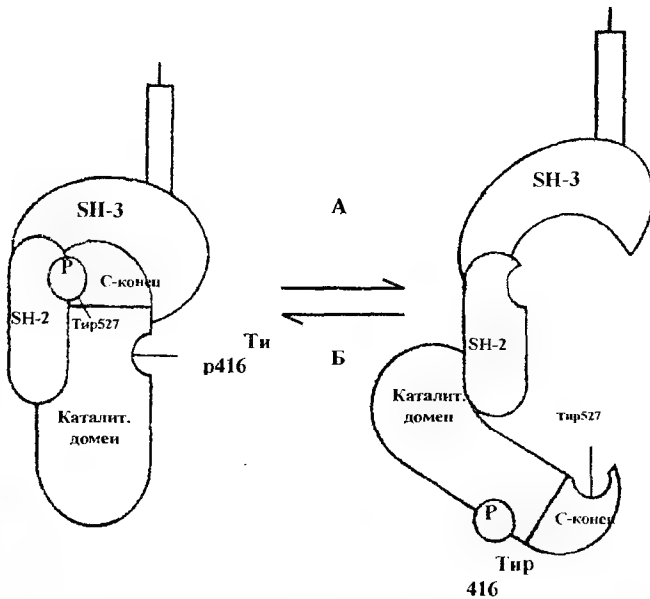


Рис. 20 . Модели активной и неактивной форм тирозинкиназы семейства src .

А - стимуляция каталитической активности тирозинкиназы после аутофосфорилирования остатка тирозина Тир416 и дефосфорилирования Тир527 на С-конце с последующим изменением конформации молекулы из неактивной формы в активную.

Б - ингибирование каталитической активности фермента после фосфорилирования Тир527 и дефосфорилирования Тир416 с последующим изменением конформации из активной формы в неактивную. При этом фосфорилированный Тир527 взаимодействует с SH2-доменом, а SH3-домен взаимодействует с участком каталитического домена (по Malarkey et al., 1995).

4.4.3. Тирозинфосфатазы

Для нормального протекания процессов внутриклеточной сигнализации необходимо координированное действие тирозинкиназ и тирозинфосфатаз (Sun, Tonks, 1994; Hunter, 1995). Тирозинфосфатазы играют важную роль в подавлении сигналов, генерируемых тирозинкиназами. Например, при стимуляции клеток ростовыми факторами или инсулином, которые активируют рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью, тирозиновое фосфорилирование самого рецептора и белков мишеней является кратковременным. Степень и продолжительность тирозинового фосфорилирования, опосредуемого рецепторными тирозинкиназами, могут быть значительно увеличены при действии ингибитора тирозинфосфатаз ортованадата Na или его пероксипроизводных (Posner et al., 1994).

Обычно, активность тирозинфосфатаз на 2 или 3 порядка больше, чем активность тирозинкиназ (Sun, Tonks, 1994). Высокая активность тирозинфосфатаз может объяснить низкий уровень тирозинового фосфорилирования клеточных белков и кратковременность тирозинового фосфорилирования. Поэтому, для того, чтобы сигнализация с участием тирозинкиназ была эффективной, активность тирозинфосфатаз также должна жестко регулироваться. Известны два принципа регуляции активности тирозинфосфатаз: определенная субклеточная локализация и фосфорилирование серин/треонина или тирозина (Sun, Tonks, 1994).

Тирозинфосфатазы относятся к большому (более 75 членов) и разнообразному суперсемейству белков, обнаруженных у всех эукариот (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993; Denu et al., 1996; Tonks, Neel, 1996). Тирозинфосфатазы специфически дефосфорилируют остатки тирозина белков и ослабляют сигналы, генерируемые тирозинкиназами. В настоящее время идентифицировано два типа тирозинфосфатаз: рецепторные (трансмембранные) и цитоплазматические (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993; Hunter, 1995, 1996). Все известные тирозинфосфатазы имеют высоко консервативный каталитический домен (около 240 аминокислот), содержащий уникальный фрагмент из 11 аминокислот [Ile/Val]-His-Cys-X-Ala-Gly-X-X-Arg-[Ser/Thr]-Gly. В состав этого фрагмента входят высоко консервативные остатки цистеина и аргинина, необходимые для каталитической активности тирозинфосфатаз (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993; Barford et al., 1994).

Выявлено 7 семейств рецепторных тирозинфосфатаз, отличающихся в основном структурой экстраклеточных доменов: CD45, LAR, RPTP β , RPTP α , RPTP μ , RPTP γ (Hunter, 1996). Шесть из семи семейств рецепторных тирозинфосфатаз содержат два каталитических

домена в цитоплазматической области. Как правило, каталитическую активность имеет домен, ближайший к мембране, в то время как удаленный от мембраны домен или неактивен или имеет очень слабую каталитическую активность. Функциональное значение присутствия двух каталитических доменов в настоящее время не установлено.

Тирозинфосфатазы семейства CD45 широко представлены в клетках иммунной системы (Т- и В-лимфоцитах, макрофагах и др.) (Walton, Dixon, 1993; Streuli, 1996) и могут служить моделью структуры рецепторных тирозинфосфатаз. Экстраклеточный домен CD45 рецептора содержит несколько участков гликозилирования и фрагмент, богатый цистеином. Далее следует один трансмембранный домен. Цитоплазматический фрагмент молекулы включает два каталитических домена (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993; Hunter, 1996). Установлено, что CD45 дефосфорилирует остатки тирозина, входящие в состав цитоплазматических тирозинкиназ семейства Src (p56lck и p59fyn), что приводит к активации тирозинкиназ (Walton, Dixon, 1993).

Нерецепторные тирозинфосфатазы имеют один каталитический домен и локализованы в цитоплазме или в ядре. Наиболее изученными семействами нерецепторных тирозинфосфатаз являются PTP1B, PTP1C, PTP1D, PTPMEG1, PTPN1 и др. (Walton, Dixon, 1993; Hunter, 1996). Тирозинфосфатазы PTP1C и PTP1D содержат в области N-конца молекулы два SH₂-домена, которые позволяют им связываться с активированными трансмембранными и бимолекулярными рецепторными тирозинкиназами. Показано, что тирозинфосфатазы PTP1C и PTP1D широко представлены в клетках иммунной системы (Walton, Dixon, 1993; Streuli, 1996).

Установлено, что цитоплазматические тирозинфосфатазы содержат также регуляторный домен, гомологичный белкам цитоскелета (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993; Hunter, 1996). Так, тирозинфосфатазы PTPMEG1 и PTPN1 включают на N-конце молекулы домены, которые на 45% идентичны белку полосы 4.1 эритроцитов, а также зрину и талину (Walton, Dixon, 1993). Учитывая то, что многие белки цитоскелета фосфорилируются по остаткам тирозина, можно предположить, что именно они являются возможными мишенями для тирозинфосфатаз, связанных с цитоскелетом (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993).

4.4.4. Ингибиторы тирозинкиназ и тирозинфосфатаз

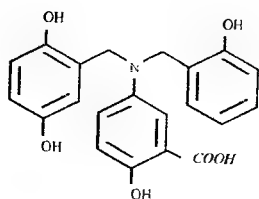
Тирозинкиназы относятся к растущему семейству онкобелков и протоонкобелков, играющих ключевую роль в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, а также в процессах сигнализации в клетках иммунной системы. Неконтролируемое увеличение активности

рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ может приводить к развитию воспалительных реакций и таких пролиферативных заболеваний как рак, атеросклероз и псориаз. В связи с этим, тирозинкиназы и сигнальные пути, в которых они участвуют, могут рассматриваться как потенциальные мишени для антипролиферативной терапии и разработки эффективных лекарственных средств (Levitzki, Gilon, 1991; Levitzki, 1992; Levitzki, Gazit, 1995).

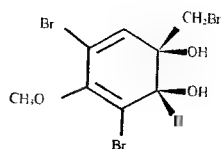
Онкобелки и протоонкобелки в целом, и тирозинкиназы в частности, являются, по-видимому, более избирательными мишенями для химиотерапии, чем ингибиторы синтеза ДНК или РНК или агенты, разрушающие структуры цитоскелета. Это обусловлено тем, что тирозинкиназы относятся к подклассу белков, активность которых является существенной для пролиферации клеток и значительно возрастает при пролиферативных заболеваниях. В связи с этим, можно ожидать, что разработка блокаторов тирозинкиназ может привести к более направленной терапии этих заболеваний.

Обнаружен целый ряд природных ингибиторов тирозинкиназ (рис. 21). Производное флавонола кверцетин (Graziani et al., 1981), изофлавоноид генистейн (Akiyama et al., 1987; Akiyama, Ogawara, 1991), лавендустин А (Onoda et al., 1989), эрбстатин (Umezawa et al., 1986) и гербимицин А (Uehara et al., 1988; Uehara, Fukazawa, 1991), выделенные из экстрактов грибов, являются эффективными ингибиторами тирозинкиназ с довольно выраженной специфичностью в микромолярной области концентраций. Другой природный блокатор тирозинкиназ аэроплизинин-1 выделен из морских губок (Kreuter et al., 1990).

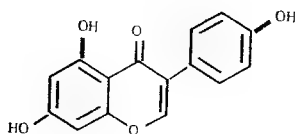
Генистейн и лавендустин А конкурируют с АТФ за связывание с тирозинкиназами. Эти соединения блокируют широкий спектр тирозинкиназ, что обусловлено по-видимому тем, что АТФ-связывающий домен является высоко консервативным у различных тирозинкиназ (Ullrich, Schlessinger, 1990). Гербимицин А необратимо блокирует внутриклеточные тирозинкиназы семейства Src (Uehara et al., 1989), тирозинкиназу рецептора ЭФР (Levitzki, Gazit, 1995). Блокирующий эффект гербимицина А предотвращается сульфгидрильными реагентами. Следует отметить, что механизм действия гербимицина А отличается от эффектов других природных блокаторов, которые обратимо ингибируют тирозинкиназы. Эрбстатин ингибирует тирозинкиназу рецептора ЭФР и тирозинкиназы семейства Src (Umezawa et al., 1986). Ранее считали, что эрбстатин и его стабильный аналог метил-2,5-дигидроксициннамат конкурируют с белковыми субстратами за взаимодействие с тирозинкиназами (Umezawa et al., 1990; Casnellie, 1991), однако недавно было обнаружено, что они могут конкурировать как с субстратами, так и с АТФ (Levitzki, Gazit, 1995).



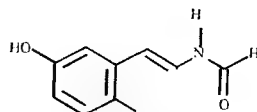
Лавендустин А



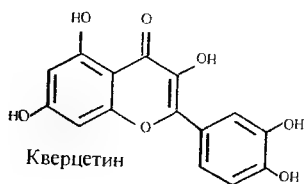
Аэроплизинин-1



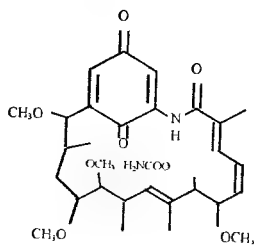
Генистейн



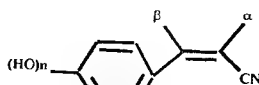
Эрбстатин



Кверцетин



Гербимицин А



Тирфостины

Рис. 21. Структура ингибиторов тирозинкиназ.

Природные ингибиторы тирозинкиназ послужили отправной точкой и прекрасной моделью для разработки новых синтетических блокаторов тирозинкиназ. Левицкий и Газит (Yaish et al., 1988; Gazit et al., 1989; Levitzki, 1992; Levitzki, Gazit, 1995) разработали высокоэффективные и селективные синтетические ингибиторы тирозинкиназ, которые получили общее название “тирфостины” (рис. 21). В основу тирфостинов была положена структура самого маленького из известных природных блокаторов тирозинкиназ, эрбстатина, и структура тирозина. Исследования показали, что тирфостины могут успешно использоваться для лечения многих пролиферативных заболеваний.

Классическими ингибиторами тирозинфосфатаз являются ортованадат Na (Na_2V_0_4) (Swarup et al., 1982a, 1982b; Gordon, 1991), перванадат, молибдат, Zn^{2+} (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993). Ортованадат Na ингибирует все группы тирозинфосфатаз в концентрации 10-100 мкМ, в то время как молибдат действует в более высоких концентрациях. В каталитическом домене всех известных тирозинфосфатаз, как цитоплазматических (Barford et al., 1994; Denu et al., 1996), так и рецепторных (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993) выявлен функционально важный остаток цистеина, который должен быть в восстановленном состоянии для осуществления фосфатазной активности. В последнее время обнаружены цитоплазматические тирозинфосфатазы PTP1C и PTP1D, содержащие два SH_2 -домена, которые связываются с фосфорилированными остатками тирозина белков. Эти SH_2 -домены, содержащие остатки цистеина, позволяют тирозинфосфатазе связываться с фосфорилированными белковыми субстратами и обеспечивают, по-видимому, определенную локализацию тирозинфосфатаз в клетке. Таким образом, остатки цистеина в SH_2 -доменах и консервативный остаток цистеина в каталитическом домене тирозинфосфатаз могут быть мишенями для ковалентной модификации сульфгидрильными реагентами. Так, фениларзиноксид, являющийся производным трехвалентного мышьяка ($\text{C}_6\text{H}_5\text{AsO}$), предпочтительно и ковалентно связывается с соседними или ближайшими SH-группами, встречающимися во фрагментах белка типа -Cys-X-X-Cys- (Webb, 1966). Относительно недавно было обнаружено, что фениларзиноксид является эффективным блокатором тирозинфосфатаз (Liao et al., 1991; Medema et al., 1991). Установлено также, что другой ингибитор тирозинфосфатаз – ортованадат Na – блокирует тирозинфосфатазу PTP1D в гепатоцитах крысы, окисляя, по-видимому, SH-группы в активном центре фермента. В пользу этого свидетельствует обратимость эффекта ортованадата Na при действии восстанавливающего агента дитиозэритреитола (Pugazhenthil et al., 1996). Показано также, что другие агенты (например, H_2O_2), которые окисляют SH-группы, также могут ингибировать тирозинфосфатазы (Hecht, Zick, 1992; Caselli et al., 1998; Lee et al., 1998). Так, N-

этилмалеимид и иодацетат, необратимо алкилирующие SH-группы, эффективно блокируют активность тирозинфосфатаз (Pot et al., 1991; Walton, Dixon, 1993). Обнаружено, что фениларзинноксид, N-этилмалеимид и H_2O_2 оказывают существенное влияние на процессы Ca^{2+} -сигналикации в перитонеальных макрофагах крысы: вызывают дозозависимое повышение $[Ca^{2+}]$, в клетках, обусловленное мобилизацией Ca^{2+} из депо и входом Ca^{2+} из наружной среды (Крутецкая и др., 1997б).

4.4.5. Модуляция активности ионных каналов тирозинкиназами и тирозинфосфатазами

Ионные каналы клеток представляют собой гликопротеины, пронизывающие мембрану. Известно, что существует множество механизмов модуляции свойств белковых молекул. Одним из наиболее широко распространенных механизмов регуляции активности белковых молекул является их фосфорилирование различными киназами (Levitan, 1985, 1988, 1994; Hille, 1992; Ismailov, Benos, 1995). Фосфорилирование белков по остаткам серина, треонина и тирозина является универсальным механизмом регуляции функционирования белков и клеточных процессов, в которых эти белки участвуют. В настоящее время достаточно хорошо изучена модуляция активности различных типов ионных каналов серин/треонинowymi киназами, такими как PKC, PKA и Ca-кальмодулин-зависимая киназа (Levitan, 1985, 1994; Hille, 1992; Catterall, 1988, 1993, 1995, 1996). Сравнительно недавно появились данные, свидетельствующие о роли тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в регуляции активности ионных каналов (Swope et al., 1992, 1995; Siegelbaum, 1994; Jonas, Kaczmarek, 1996; обзор Крутецкая, Лебедев, 1998; Davis et al., 2001).

В последнее время обнаружено, что активность разных типов ионных каналов в различных объектах эффективно модулируется рецепторными и цитоплазматическими тирозинкиназами и тирозинфосфатазами (Крутецкая, Лебедев, 1998). Мишенями для тирозинкиназ и тирозинфосфатаз являются: потенциал-зависимые K^+ -, Na^+ - и Ca^{2+} -каналы (Huang et al., 1993; Peralta, 1995; Kusaka, Sperelakis, 1996; Wijetunge et al., 1992; Wijetunge, Hughes, 1995a, 1995b); Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы (Prevarskaya et al., 1995); лиганд-управляемые каналы NMDA-рецепторов, никотиновых ацетилхолиновых рецепторов и ГАМК_A-рецепторов (Swope et al., 1992, 1995); IP_3 -чувствительные каналы Ca^{2+} -выброса (Jayaraman et al., 1996); Cl^- -каналы (Sorota, 1995); каналы щелевых контактов (Lau et al., 1996); рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы (Sargeant et al., 1993a, 1993b; Крутецкая и др., 1997a).

Известно, что тирозинкиназы играют важную роль в процессах сигнализации в клетках иммунной системы (Levitzki, Gazit, 1995). Установлено, что ингибиторы тирозинкиназ блокируют активацию В- и Т-лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов и макрофагов (Goldman et al., 1994; Dackiw et al., 1997).

Нами показано, что два структурно различных ингибитора тирозинкиназ генистейн и метил-2,5-дигидроксициннамат ингибируют вход Ca^{2+} , индуцируемый пуриnergическими агонистами (АТФ, УТФ) и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз (тапсигаргин, циклопязониковая кислота) в перитонеальных макрофагах крысы (Крутецкая и др., 1997а; Крутецкая, Лебедев, 1998).

С помощью метода пэтч-клэмп в конфигурации "whole-cell" на перитонеальных макрофагах крысы установлено, что внеклеточное приложение генистейна (100 мкМ) или метил-2,5-дигидроксициннамата (100 мкМ) приводит к быстрому и значительному (на 40 %) подавлению пиковой амплитуды K^{+} -токов выходящего выпрямления при всех значениях мембранного потенциала (Крутецкая, Лебедев, 1998). После воздействия ингибиторов тирозинкиназ наблюдается также существенное ускорение кинетики K^{+} -инактивации. Ингибирующее действие агентов практически полностью обращается при отмывании клеток в контрольном растворе. Чтобы исключить возможность прямого блокирующего действия генистейна на K^{+} -каналы, было исследовано влияние дайдзейна - структурного аналога генистейна, не способного ингибировать тирозинкиназы. Установлено, что дайдзейн (100 мкМ) не оказывает существенного влияния на характеристики K^{+} -токов. Это позволяет предположить, что ингибирование K^{+} -токов под действием генистейна и метил-2,5-дигидроксициннамата может быть связано с блокированием эндогенных тирозинкиназ. В то же время, ингибиторы тирозинфосфатаз ортованадат Na (50 мкМ) или фениларзиноксид (100 мкМ) вызывают увеличение амплитуды K^{+} -токов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли фосфорилирования по тирозину в регуляции активности потенциал-зависимых K^{+} -каналов в мембране перитонеальных макрофагов крысы (Крутецкая, Лебедев, 1998).

Кожа амфибий и мочевого пузыря амфибий являются удобными модельными объектами для выяснения механизмов трансэпителиального транспорта ионов, а также исследования модуляции транспорта различными фармакологическими агентами и системами вторичных посредников. Инсулин стимулирует трансэпителиальный транспорт Na^{+} в ряде эпителиальных систем: коже амфибий, мочевом пузыре амфибий, клетках почки. Для выяснения механизмов действия инсулина на транспорт Na^{+} в коже лягушки мы использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрировали вольт-амперные характеристики кожи лягушки *Rana temporaria* (Крутецкая, Лебедев,

1998). Показано, что инсулин (0,5-1 мкМ), добавленный в раствор, омывающий базолатеральную (серозную) поверхность кожи, существенно увеличивает ток короткого замыкания (I_{sc}). Увеличение I_{sc} сопровождалось сдвигом трансэпителиального потенциала (V_{oc}) кожи в сторону гиперполяризации и увеличением полной трансэпителиальной проводимости (g_r). Эффект инсулина развивался через 15-30 минут. В присутствии блокатора эпителиальных Na^+ -каналов амилорида (10 мкМ) инсулин не вызывает увеличения I_{sc} , что свидетельствует о том, что инсулин увеличивает преимущественно амилорид-чувствительную компоненту тока короткого замыкания.

Результаты наших исследований, а также данные, полученные на коже лягушки (Schoen, Erij, 1987), эпителиальных клетках почки (Matsumoto et al., 1993) и клетках эпителия легких крысы (Hagiwara et al., 1992), свидетельствуют о том, что инсулин стимулирует транспорт Na^+ через амилорид-чувствительные Na^+ -каналы в апикальной мембране эпителиальных клеток. В пользу этого свидетельствуют полученные нами данные о том, что инсулин преимущественно увеличивает амилорид-чувствительную компоненту тока короткого замыкания в коже лягушки. В то же время, нельзя исключить возможность того, что инсулин стимулирует также активность $Na^+-K^+-ATФазы$, локализованной в базальной мембране. Однако, активация $Na^+-K^+-ATФазы$ является вторичным процессом по отношению к вызываемому инсулином увеличению внутриклеточной концентрации ионов Na^+ , $[Na^+]_i$. Таким образом, можно предположить, что инсулин стимулирует транспорт Na^+ через апикальную мембрану клеток, что приводит к увеличению $[Na^+]_i$; повышение $[Na^+]_i$ вторично вызывает активацию $Na^+-K^+-ATФазы$. Такой механизм действия инсулина был предложен для ряда объектов (Ewart, Klip, 1995).

Инсулин связывается с рецепторами, имеющими собственную тирозинкиназную активность. Рецепторы инсулина локализованы, по-видимому, преимущественно в базолатеральной мембране эпителиальных клеток. Многие из эффектов инсулина связаны с активацией его рецепторной тирозинкиназы. Вместе с тем, нельзя исключить возможное участие в действии инсулина цитоплазматических тирозинкиназ. С использованием ингибиторов тирозинкиназ мы исследовали возможную роль тирозинкиназ в действии инсулина. Природный специфический ингибитор тирозинкиназ изофлавоноид генистейн конкурентно блокирует связывание АТФ с тирозинкиназами. Стабильный аналог эрбстатина метил-2,5-дигидроксициннамат конкурирует с белковыми субстратами за связывание с тирозинкиназами. Показано, что предварительная обработка (в течение часа) апикальной поверхности кожи генистейном (100 мкМ) или метил-2,5-дигидроксициннаматом (10-20 мкМ) значительно ослабляет, а в некоторых случаях практически полностью предотвращает

последующее действие инсулина. Это свидетельствует о том, что стимулирующее влияние инсулина на трансэпителиальный транспорт Na^+ в коже лягушки связано с активацией тирозинкиназ. Кроме влияния на индуцируемый инсулином транспорт Na^+ , генистейн и метил-2,5-дигидроксициннамат также уменьшают базальный уровень I_{sc} , что свидетельствует о роли тирозинкиназ в модуляции транспорта Na^+ в коже лягушки. Ингибитор тирозинфосфатаз, ортованадат Na (20-60 мкМ), усиливает эффект инсулина. Полученные данные позволяют заключить, что фосфорилирование белков-мишеней по тирозину играет важную роль в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ в коже лягушки в ответ на приложение инсулина (Крутецкая, Лебедев, 1998).

Таким образом, анализ последних экспериментальных данных свидетельствует о том, что активность самых различных типов ионных каналов в целом ряде типов клеток эффективно модулируется рецепторными и цитоплазматическими тирозинкиназами и тирозинфосфатазами.

4.5. Гуанилатциклазная система

Циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ) является еще одним циклическим нуклеотидом, влияющим на процессы Ca^{2+} -сигналикации в различных типах клеток. Хотя цГМФ был обнаружен в 1963 г. (Ashman et al., 1963), а гуанилатциклаза, катализирующая синтез цГМФ из Mg-ГТФ, была открыта в 1969 г. (Hardman, Sutherland, 1969), только в конце семидесятых и восьмидесятых годов была установлена важная роль гуанилатциклазной системы в фоторецепторах и гладких мышцах. В настоящее время показано, что цГМФ опосредует эффекты широкого спектра гормонов, натрийуретических пептидов, лекарственных средств и токсинов в различных типах клеток (Lincoln, Cornwell, 1993; Schmidt et al., 1993).

Синтез цГМФ осуществляет фермент гуанилатциклаза (ГЦ). Выделяют два типа ГЦ: связанные с мембранами рецепторные ГЦ и растворимые или цитоплазматические ГЦ (Schmidt et al., 1993). Рецепторные ГЦ активируются пептидными лигандами, которые связываются с мембранными рецепторами, имеющими трансмембранный домен и цитоплазматический домен, обладающий гуанилатциклазной активностью. В тканях человека и крысы идентифицированы 3 типа рецепторных ГЦ. Натрийуретический пептид из предсердия и натрийуретический пептид из мозга связываются с рецепторной ГЦА. Натрийуретический пептид типа С взаимодействует с ГЦВ. Рецепторные ГЦ третьего типа, называемые также ГЦС, активируются

термостабильным энтеротоксином из *E. coli* и обнаруженным недавно эндогенным кишечным пептидом гуанилином.

Растворимые ГЦ представляют собой гетеродимер из α - и β -субъединиц (Schmidt et al., 1993). Мол. масса растворимой ГЦ из разных тканей составляет около 150 кДа. Растворимая ГЦ активируется новым внутриклеточным и межклеточным мессенджером - короткоживущей мембранопроницаемой молекулой окиси азота (NO).

Через образование эндогенной NO действуют широко применяемые лекарственные средства - нитроглицерин, нитропруссид Na, нитросорбид (Monscada et al., 1991). Цитозольная форма ГЦ ингибируется известным красителем метиленовым голубым (метиленовой синькой), 6-анилино-5, 8-хинолиндионом (соединением LY83583).

Также как и цГМФ, NO играет важную роль в регуляции процессов Ca^{2+} -сигнализации и Ca^{2+} -гомеостаза в различных типах клеток (Clementi et al., 1995a, 1995b; Clementi, 1998). В клетках млекопитающих NO синтезируется из L-аргинина с помощью ферментов NO-синтаз. Выделяют три изоформы этого фермента: I, II и III (Schmidt et al., 1993). NO-синтаза I типа (brain-type, мол. масса 160 кДа) и NO-синтаза III типа (endothelium-type, мол. масса 133 кДа) являются конститутивными, постоянно экспрессированы во многих тканях; активируются после взаимодействия с Ca^{2+} и кальмодулином. NO-синтаза II типа (macrophage-type, мол. масса 130 кДа) нечувствительна к Ca^{2+} и является индуцибельной, экспрессируется после иммунологической активации клеток цитокинами, такими как интерфероны, интерлейкин-I, фактор некроза опухолей, а также бактериальными липополисахаридами. Глюкокортикоиды и некоторые интерлейкины (интерлейкин-4 и интерлейкин-10) ингибируют индукцию NO-синтазы II типа (MacMicking et al., 1997).

Все изоформы NO-синтаз являются гомодимерами из субъединиц с мол. массой 130-160 кДа. Каталитические участки всех изоформ NO-синтазы включают цитохром P_{450} -подобный домен и домен, связывающий L-аргинин. К регуляторным участкам относятся кальмодулин-связывающий фрагмент и различные участки фосфорилирования. Все изоформы NO-синтазы связывают кальмодулин Ca^{2+} -зависимым (NO-синтазы I и III типов) или Ca^{2+} -независимым (NO-синтаза II типа) образом. NO-синтазы I и III типов связывают кальмодулин и полностью активируются при повышении $[\text{Ca}^{2+}]$. Антагонисты кальмодулина, кальмидазолий и трифторперазин, блокируют связывание кальмодулина и ингибируют вызываемое увеличением $[\text{Ca}^{2+}]$, образование NO. NO-синтазы II типа изолированы из клеток печени и макрофагоподобных клеточных линий (Schmidt et al., 1993). Подобно NO-синтазам I и III типов, NO-синтаза II типа из клеток печени активируется при связывании с кальмодулином, но этот процесс не зависит от $[\text{Ca}^{2+}]$. В то же время,

NO-синтаза II типа из макрофагов постоянно связана с кальмодулином и постоянно находится в активном состоянии (MacMicking et al., 1997). Ингибиторами NO-синтаз являются не утилизируемые аналоги аргинина, например, N-нитро-L-аргинин (L-NA) и L-N-(1-иминоэтил)-орнитин (L-NIO) (Xu et al., 1994; Clementi et al., 1995b).

Таким образом, активированная NO-синтаза катализирует образование NO из L-аргинина. NO активирует цитоплазматическую ГЦ, катализирующую образование цГМФ. В клетках эукариот выявлены 3 основных типа внутриклеточных рецепторных белков, с которыми взаимодействует цГМФ: цГМФ-зависимые протеинкиназы (протеинкиназы G), цГМФ-регулируемые ионные каналы и цГМФ-регулируемые фосфодиэстеразы (Lincoln, Cornwell, 1993; Schmidt et al., 1993).

Протеинкиназа G была идентифицирована в 1970 г. (Kuo, Greengard, 1970). Протеинкиназа G менее широко распространена, чем PKA. Максимальная концентрация протеинкиназы G обнаружена в легких, мозжечке, гладких мышцах, тромбоцитах (Francis, Corbin, 1994). Показано, что по структуре и функции протеинкиназа G гомологична PKA. Как и PKA, протеинкиназа G фосфорилирует белковые субстраты по остаткам серина или треонина (Francis, Corbin, 1994). В клетках позвоночных идентифицированы два основных класса протеинкиназ G: I и II типа (Lincoln, Cornwell, 1993; Schmidt et al., 1993; Francis, Corbin, 1994). Протеинкиназа GI является в основном цитоплазматической; идентифицирована в гладких мышцах, тромбоцитах, мозжечке, миоцитах сердца, нейтрофилах. Протеинкиназа GII связана с плазматический мембраной и обнаружена только в эпителиальных клетках кишечника.

Протеинкиназа GI представляет собой гомодимер из двух идентичных субъединиц с мол. массой 78 кДа. С каждым мономером связываются две молекулы цГМФ. В отличие от PKA, каждая субъединица протеинкиназы G содержит и регуляторную (связывание цГМФ) и каталитическую (связывание белковых субстратов) активность. Каждая субъединица (670 аминокислот) протеинкиназы GI имеет следующие функциональные домены, начиная с N-конца молекулы: домен, участвующий в димеризации субъединиц; домен, содержащий участки аутофосфорилирования; два домена, связывающих цГМФ с низким и высоким сродством, соответственно; домен, связывающий Mg^{2+} /АТФ; домен, взаимодействующий с белковыми субстратами, и обеспечивающий каталитическую функцию; С-терминальный домен. Asn-483 в каталитическом домене играет ключевую роль в переносе γ -фосфата с АТФ на остатки серина или треонина белковых субстратов. Выявлены две изоформы протеинкиназы GI: I α и I β , отличающиеся 100 аминокислотами на N-конце молекулы. Протеинкиназа GII представляет собой мономер с мол. массой 86 кДа; с мономером связывается 1

молекула цГМФ (Lincoln, Cornwell., 1993; Schmidt et al., 1993; Francis, Corbin, 1994).

Функциональная роль протеинкиназы G1 наиболее изучена в клетках гладких мышц, тромбоцитах и нейтрофилах. Так, обнаружено, что активация протеинкиназы G1 приводит к уменьшению $[Ca^{2+}]_i$ в клетках гладких мышц (Lincoln, Cornwell, 1993). Предполагают, что это может быть связано с активацией Ca^{2+} -АТФазы в плазматической мембране и в мембране саркоплазматического ретикулума. В тромбоцитах человека активация протеинкиназы G1 также приводит к подавлению индуцируемого агонистами повышения $[Ca^{2+}]_i$, что может быть обусловлено ингибированием ФЛС (Geiger et al., 1992, 1994). Для нейтрофилов человека выявлено участие протеинкиназы G1 в регуляции процессов хемотаксиса и дегрануляции (Wyatt et al., 1991). Обнаружено, что активация нейтрофилов хемотактическим пептидом N-формилметионил-лейцил-фенилаланином (fMLP) или Ca^{2+} -ионофором A23187 приводит к существенному повышению $[Ca^{2+}]_i$, которое стимулирует образование NO. NO активирует ГЦ, катализирующую образование цГМФ. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ вызывает поляризацию нейтрофилов и колокализацию протеинкиназы G1 с белком цитоскелета виментином. После этого активированная цГМФ протеинкиназа G1 может катализировать фосфорилирование виментина. Локализация протеинкиназы G1 и виментина коррелирует с его фосфорилированием, поляризацией и дегрануляцией нейтрофилов, что свидетельствует об участии в этих процессах протеинкиназы G1 (Wyatt et al., 1991). Вышеизложенное указывает на то, что подобно другим серин-треониновым киназам, протеинкиназа G1 связана с субклеточными структурами, в частности со структурами цитоскелета в клетках эукариот. «Заякоривание» протеинкиназы G1 около соответствующих субстратов в определенных участках клетки позволяет определенным внеклеточным сигналам вызывать быстрое и эффективное фосфорилирование белков протеинкиназой G1.

Функциональная роль цГМФ наиболее хорошо изучена в фоторецепторных системах. Именно в фоторецепторах позвоночных был выявлен новый механизм действия циклических нуклеотидов в процессах передачи сигналов, состоящий в прямой активации ионных каналов плазматической мембраны без участия протеинкиназы.

Фоторецепторы позвоночных деполяризованы в темноте. Обнаружено, что это связано с открыванием катионных каналов, прямо активируемых цГМФ (Fesenko et al., 1985). Каналы проницаемы для Na^+ и Ca^{2+} . Фотоактивированный родопсин активирует G-белок трансдуцин, стимулирующий фосфодиэстеразу цГМФ. Связанное с этим снижение концентрации цГМФ приводит к закрыванию каналов и гиперполяризации мембраны. За счет работы Na^+/Ca^{2+} -обменника

происходит снижение $[Ca^{2+}]_i$. Уменьшение $[Ca^{2+}]_i$ в свою очередь приводит к увеличению активности ГЦ, повышению концентрации цГМФ и последующему открыванию каналов (Yau, 1994). Катионные каналы, управляемые цГМФ, имеют высокую проницаемость для Ca^{2+} ($P_{Ca}/P_{Na}=10$). В темноте существует баланс между входом Ca^{2+} по этим каналам и выходом Ca^{2+} из клетки с участием Na^+/Ca^{2+} -обменника. Происходящее при освещении закрытие каналов прекращает вход Ca^{2+} , но выход Ca^{2+} продолжается, что приводит к снижению $[Ca^{2+}]_i$ (Yau, 1994).

цГМФ-активируемый катионный канал из наружных сегментов палочек сетчатки быка (Kaupp et al., 1989) представляет собой полипептид с мол. массой 79 кДа (690 аминокислот), включающий 6 трансмембранных сегментов. С-терминальный гидрофильный домен содержит участок связывания цГМФ (аминокислотные остатки 498-577). Выявлена 50%-ная гомология между цГМФ-связывающим фрагментом катионного канала и цГМФ-связывающими доменами протеинкиназы G. Показано, что эти домены содержат консервативный остаток треонина, важный для связывания цГМФ. цГМФ связывается с каналом с очень низким сродством и может быстро диссоциировать от связывающего участка на белке канала. В цГМФ-управляемом канале идентифицирован фрагмент, сходный с S4 сегментом, выполняющим функцию сенсора напряжения в потенциал-зависимых ионных каналах. Однако, канал в фоторецепторах не может активироваться напряжением в отсутствие циклических нуклеотидов. Более того, цГМФ-активируемый канал имеет участок, гомологичный поре K^+ -канала. На основании вышеизложенного, предполагают, что каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами, и потенциал-зависимые каналы могут иметь общего предка (Yau, 1994).

Показано, что цГМФ-управляемые каналы в палочках сетчатки эффективно блокируются полиаминами (спермин, спермидин, путресцин), приложенными к наружной или внутренней поверхности мембраны. Предполагают, что это может играть важную роль в уменьшении шумов при передаче сигналов в фоторецепторах (Lu, Ding, 1999). В последнее время обнаружено также, что катионные каналы, активируемые цГМФ в палочках сетчатки, модулируются тирозинкиназами и тирозинфосфатазами, что может являться новым механизмом регуляции чувствительности палочек к свету (Molokanova et al., 1997, 1999).

Третьим типом рецепторных внутриклеточных белков, с которыми взаимодействует цГМФ, являются цГМФ-регулируемые фосфодиэстеразы. Изменение активности этих ферментов вызывает изменение внутриклеточной концентрации циклических нуклеотидов, что приводит к фосфорилированию или дефосфорилированию белков и другим клеточным процессам. Выделяют два основных типа цГМФ-

связывающих фосфодиэстераз: цГМФ-стимулируемые фосфодиэстеразы и цГМФ-связывающие (цГМФ-специфические) фосфодиэстеразы (Lincoln, Cornwell, 1993; Schmidt et al., 1993). Они аллостерически регулируются связыванием цГМФ с некаталитическим цГМФ-связывающим участком. цГМФ-стимулируемая фосфодиэстераза идентифицирована в клетках мозга, миоцитах сердца, эндотелиальных клетках; представляет собой димер из двух идентичных субъединиц с мол. массой 105 кДа. С-терминальный домен фермента содержит каталитический участок для гидролиза циклических нуклеотидов (цГМФ и цАМФ). На N-терминальном домене фосфодиэстеразы находится фрагмент, связывающий цГМФ. Установлено, что 2 молекулы цГМФ взаимодействуют с некаталитическими участками димера. цГМФ-связывающие (цГМФ-специфические) фосфодиэстеразы специфически гидролизуют цГМФ. Уникальная фосфодиэстераза из палочек сетчатки имеет мол. массу 88 кДа, а фосфодиэстеразы из гладких мышц, легких и тромбоцитов - 93 кДа. Все типы цГМФ-связывающих фосфодиэстераз специфически ингибируются 3-изобутил-1-метил ксантином (IBMX), который стимулирует связывание цГМФ с аллостерическими участками фермента. Запринаст специфически ингибирует гидролиз цГМФ, катализируемый цГМФ-специфическими фосфодиэстеразами (Lincoln, Cornwell, 1993; Schmidt et al., 1993).

4.6. Заключение по разделу 4

Одним из самых загадочных свойств процессов внутриклеточной сигнализации является специфичность сигнализации, особенно, если учесть, что более, чем 30 гормонов используют универсальные вторичные мессенджеры (Ca^{2+} , фосфолипиды или цАМФ) для передачи информации от плазматической мембраны к внутриклеточным эффекторам. В большинстве случаев конечным этапом является активация протеинкиназ или фосфатаз, которые, в свою очередь, изменяют состояние фосфорилирования клеточных белков-мишеней. До сих пор неясно, каким образом определенные гормоны активируют конкретный пул протеинкиназ или фосфатаз для запуска определенных внутриклеточных событий. В настоящее время привлекает внимание "гипотеза мишени" ("targeting hypothesis"), предполагающая, что процессы фосфорилирования контролируются частично тем, в какой области клетки локализованы киназы и фосфатазы (Dell 'Acqua, Scott, 1997). Таким образом, в соответствии с этим предположением, специфичность протеинкиназ и фосфатаз может достигаться путем компартментализации их с определенными субстратами, что обеспечивается взаимодействием

киназ и фосфатаз с определенными "заякоривающими белками" (Coghlan et al., 1995; Dell 'Acqua, Scott, 1997).

Кроме того, в последнее время появились данные о том, что специфичность сигнализации может достигаться компартиментализацией сигнальных комплексов в определенных участках мембраны. Показано, что рецепторы, G-белки и эффекторы менее подвижны в мембране, чем предполагалось ранее, и могут образовывать сложные супрамолекулярные комплексы, что повышает специфичность белок-белковых взаимодействий (Neubig, 1994). Участками сборки сигнальных комплексов, включающих рецепторы, G-белки, эффекторы и внутриклеточные мишени для генерируемых вторичных посредников могут быть специализированные участки плазматической мембраны, называемые кавеолами (Anderson, 1998; Okamoto et al., 1998).

Кавеолы или пузырьки плазматической мембраны представляют собой не покрытые клатрином впячивания плазматической мембраны (рис. 22). Основным компонентом оболочки кавеол является интегральный мембранный белок кавеолин (мол. масса 21 кДа) (Rothberg et al., 1992; Okamoto et al., 1998). Семейство кавеолинов включает 3 изоформы: кавеолин-1, кавеолин-2 и кавеолин-3. Кавеолин-1 и кавеолин-2 экспрессированы в адипоцитах, эндотелиальных клетках и фибробластах; кавеолин-3 идентифицирован в мышечных клетках (Okamoto et al., 1998). Кавеолины образуют гомо- и гетероолигомеры, которые взаимодействуют с холестерином и гликофинголипидами. Эти белок-белковые и белок-липидные взаимодействия являются движущей силой для образования кавеол (Anderson, 1998; Okamoto et al., 1998).

Обнаружено, что в кавеолах в больших количествах представлены такие компоненты сигнальных путей, как: рецептор IP_3 (Fujimoto et al., 1992), рецепторы, связанные с G-белками (Chun et al., 1994), различные гетеротримерные G-белки (Lisanti et al., 1994; Li et al., 1995), нерцепторные тирозинкиназы семейства Src (Lisanti et al., 1994; Li et al., 1996), Ca^{2+} -АТФаза (Fujimoto, 1993), Ras белки (Li et al., 1996), рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью (Gustavsson et al., 1999), NO-синтаза (Garcia-Cardena et al., 1996; Segal et al., 1999), ПКС (Oka et al., 1997; Rybin et al., 1999), ПКА (Razani et al., 1999). Многие молекулы, идентифицированные в кавеолах, участвуют в процессах Ca^{2+} сигнализации в клетках.

Кавеолы обнаружены во многих типах клеток, таких как эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, фибробласты, адипоциты. В последнее время показано, что кавеолы в больших количествах присутствуют в плазматической мембране перитонеальных макрофагов (Kiss, Geuze, 1997). Можно предположить, что в поддержании целостности кавеол принимают участие элементы цитоскелета. Так, обнаружено, что IP_3 -рецепторы, связанные с кавеолами в плазматической

мембране, взаимодействуют с актиновыми микрофиламентами (Fujimoto et al., 1995). Активация макрофагов фактором стимуляции колоний (CSF-1) приводит к образованию мультимерных цитоплазматических комплексов, включающих сигнальные белки (фосфатидилинозитол-3-киназа, тирозинкиназы, белок Grb2 и др.) и компоненты цитоскелета (паксиллин, виментин, F-актин, тропомиозин) (Yeung et al., 1998). В последнее время показано, что кавеолин-1 взаимодействует с актин-связывающим белком филламином (Stahlhut, Van Deurs, 2000).

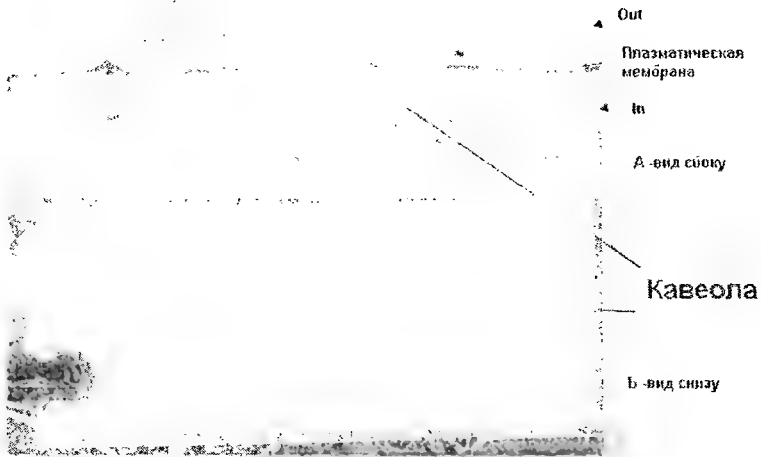


Рис. 22. Электронные микрофотографии впячиваний плазматической мембраны (кавеол).

А- вид сбоку; В- вид снизу (по Rothberg et al., 1992).

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о существовании в мембранах эукариот специализированных микродоменов, обогащенных холестерином и сфинголипидами, которые были названы "rafts" (плот, паром) (Brown, London, 1998a; Rietveld, Simons, 1998). "Rafts" представляют собой упорядоченные жидкие домены в мембране (liquid ordered phase domains) (Brown, London, 1998b).

Показана важная роль этих липидных микродоменов в процессах передачи сигналов в клетках. Так, обнаружено, что в микродоменах, обогащенных холестерином и сфинголипидами, концентрируются многие белки, участвующие в процессах внутриклеточной сигнализации: NO-синтаза, Ras белки, тирозинкиназы семейства Src (Melkonian et al., 1999), гетеротримерные G-белки (Moffett et al., 2000), потенциал-зависимые K^+ -каналы Kv2.1 (Martens et al., 2000). Миристоилирование и пальмитоилирование белков является необходимым и достаточным для взаимодействия их с липидными микродоменами (Melkonian et al., 1999; Moffett et al., 2000). Показано, что "rafts" играют важную роль в обеспечении структурно-функциональной организации кавеол (Brown, London, 1998a,b). Однако в последнее время обнаружено участие этих липидных микродоменов в процессах передачи сигналов и в тех клетках, в которых кавеолы отсутствуют (Т-лимфоциты, базофилы) (Janes et al., 1999).

Для каждого фактора, действующего на клетку, можно, как правило, выделить основную сигнальную систему, преимущественно определяющую характер формируемого ответа. Однако в большинстве случаев, процесс активации находится под контролем не одной, а нескольких систем внутриклеточной сигнализации, так что важным фактором формирования ответа клеток становится взаимосвязь этих систем.

Разнообразные взаимодействия сигнальных систем обеспечивают уникальность пути формирования каждого процесса, несмотря на использование для передачи информации внутри клетки небольшого числа универсальных посредников. Несомненно, что исследование механизмов, обеспечивающих совместный контроль передачи информации в клетке различными системами посредников, будет основным направлением работ в этой области в ближайшие годы.

5. Механизмы Ca^{2+} -сигнализации в клетках

5.1. Ca^{2+} - универсальный вторичный мессенджер

Исследование механизмов формирования клеточного ответа на стимул - одна из наиболее активно развивающихся областей клеточной биологии. В последние годы достигнут значительный прогресс в понимании путей активации клеток, в которых роль основного вторичного посредника выполняют ионы Ca^{2+} (Berridge, Irvine, 1989; Berridge, 1990; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992a; Berridge, 1993; Clapham, 1995a, 1995b; Bootman et al., 1997; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 2001). Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации ионов

Ca^{2+} играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, секреция, сокращение, передача нервного импульса, иммунный ответ и т.д. (Berridge, 1995b, 1997a, 1997b; Berridge et al., 1998).

Впервые важная роль Ca^{2+} как внутриклеточного регулятора была установлена английским физиологом Сиднеем Рингером в 1883 г. (Ringer, 1883) в классических опытах, показавших, что механическая активность сердца тормозится, если во внешней среде нет Ca^{2+} . Спустя 100 лет Тьен с соавторами (Tsien et al., 1984) сообщили о возможности измерения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в клетках млекопитающих с помощью Ca^{2+} -флуоресцентного зонда Quin 2. К настоящему времени существует уже несколько поколений высоко чувствительных флуоресцентных Ca^{2+} -зондов, позволяющих измерять концентрацию Ca^{2+} в цитозоле и во внутриклеточных органеллах (Grynkiewicz et al., 1985; Kao, 1994; Takahashi et al., 1999; Baylor, Hollingworth, 2000).

Ca^{2+} является универсальным вторичным мессенджером, действующим в клетках бактерий, растений и животных. Ca^{2+} необходим для жизнедеятельности клеток, и в то же время длительное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводит к гибели клеток (Berridge et al., 1998). Ca^{2+} не может подвергаться метаболическим превращениям, как другие посредники, поэтому $[\text{Ca}^{2+}]_i$ должна жестко регулироваться. В связи с этим, в клетках в процессе эволюции возникли системы белков, которые могут удерживать Ca^{2+} в связанном состоянии или транспортировать его из клетки. Чтобы избежать создания высокой $[\text{Ca}^{2+}]_i$, опасной для клеток, концентрация свободного Ca^{2+} в покоящихся клетках поддерживается на очень низком уровне, в 1000-2000 раз меньшей, чем концентрация Ca^{2+} в наружной среде (1-2 мМ). Другим следствием жесткой регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ является то, что Ca^{2+} диффундирует очень медленно и на малые расстояния в цитоплазме. Установлено, что ион Ca^{2+} диффундирует на расстояние 0,1-0,5 мкМ до взаимодействия с Ca^{2+} -связывающим белком (Allbritton et al., 1992). Чтобы избежать с одной стороны проблему цитотоксичности высоких $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а с другой - проблему медленной диффузии Ca^{2+} в цитоплазме, клетки выработали простой механизм сигнализации, основанный на генерации коротких импульсов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ca^{2+} -спайков) (Berridge, 1993; Clapham, 1995a; Berridge, 1997a, 1997b).

Активация многих мембранных рецепторов приводит к двухфазному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вследствие мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо и входа Ca^{2+} по градиенту концентрации из наружной среды (рис. 23).

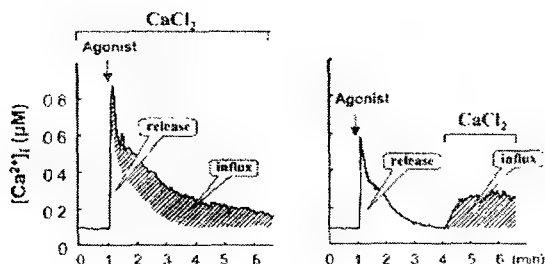


Рис. 23. Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} $[Ca^{2+}]_i$ при стимуляции клеток агонистами.

Слева: типичный Ca^{2+} -сигнал, регистрируемый в среде, содержащей 2 мМ Ca^{2+} . Добавление к клеткам агониста (agonist) вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: кратковременный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо (release) и выраженное длительное «плато», обусловленное входом Ca^{2+} из наружной среды (influx).

Справа: агонист добавляется к клеткам, находящимся в бескальциевой среде и регистрируется фаза мобилизации Ca^{2+} из депо (release). Далее в среду вводится 2 мМ Ca^{2+} и регистрируется фаза входа Ca^{2+} в клетку (по Zhu, Vimbauer, 1998).

5.2. Механизмы мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо

Все клетки млекопитающих, за исключением эритроцитов, содержат органеллы, способные аккумулировать Ca^{2+} против электрохимического градиента. При соответствующих условиях Ca^{2+} выходит из этих депо медленно (из митохондрий, секреторных гранул) или быстро (из саркоплазматического ретикула (СР) мышечных клеток, Ca^{2+} -депо немышечных клеток). Ca^{2+} -запасующие органеллы, способные к быстрому обмену кальцием с цитоплазмой, содержат Ca^{2+} -буферные системы и Ca^{2+} -каналы, по которым Ca^{2+} освобождается из депо.

5.2.1. Ca^{2+} - депо мышечных клеток

В мышечных клетках Ca^{2+} -депо служит СР. Различают свободные, продольные цистерны СР и терминальные цистерны, контактирующие с впячиваниями сарколеммы (цистернами Т-системы). Структурная гетерогенность СР определяется различными функциями его отделов: продольные цистерны поглощают Ca^{2+} из миоплазмы. Терминальные цистерны способны к выбросу Ca^{2+} в ответ на деполяризацию сарколеммы. Мембрана СР содержит Ca^{2+} -АТФазу (мол. масса 110 кДа), осуществляющую сопряжение гидролиза АТФ с переносом Ca^{2+} . Ca^{2+} -АТФаза составляет 90% белков СР и транспортирует Ca^{2+} в стехиометрии 2:1 по отношению к АТФ. Ca^{2+} -АТФаза является классическим интегральным мембранным белком, имеющим 10 трансмембранных α -спиральных сегментов (M1-M10). В цитоплазме расположены домены Ca^{2+} -АТФазы, участвующие в фосфорилировании и связывании нуклеотидов (АТФ) (Mac Lennan et al., 1997) (рис. 24). Специфический ингибитор SERCA Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин связывается с трансмембранным сегментом M3. В связывании Ca^{2+} участвуют трансмембранные сегменты M4, M5 и M6. При связывании 1 молекулы АТФ с цитоплазматическим нуклеотид-связывающим доменом Ca^{2+} -АТФазы через мембрану СР в полость депо транспортируются 2 иона Ca^{2+} (Mac Lennan et al., 1997). Ca^{2+} -АТФаза СР сердечных, скелетных и гладких мышц регулируется кислым протеолипидом фосфоламбаном (мол. масса 25 кДа). Молекула фосфоламбана состоит из пяти идентичных протомеров (мол. массой около 5 кДа), тесно контактирующих друг с другом и пронизывающих мембрану СР. Фосфоламбан связывает АТФ в стехиометрии 1:1 и может фосфорилироваться как цАМФ-зависимой протеинкиназой, так и Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназой. Дефосфорилированный фосфоламбан связан с Ca^{2+} -АТФазой и ингибирует ее активность. Фосфорилирование фосфоламбана приводит к его отделению и активации АТФазы (James et al., 1989). Ca^{2+} -АТФазы в СР являются продуктами двух различных генов: SERCA 1 и SERCA 2. SERCA 1 АТФазы экспрессированы в скелетных мышцах, а SERCA 2 АТФазы в сердечных и скелетных мышцах (Pozzan et al., 1994; Hussain, Inesi, 1999).

Белок кальсеквестрин (мол. масса 42 кДа) и Ca^{2+} -связывающий белок с высоким сродством к Ca^{2+} (мол. масса 55 кДа) локализованы внутри цистерн СР. Кальсеквестрин, кислый растворимый белок, содержащий много остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, составляет до 20% всего белка в терминальных цистернах скелетных мышц. Кальсеквестрин связывает большую часть Ca^{2+} , поступающего в

терминальные цистерны при работе Ca^{2+} -АТФазы. Одна молекула кальсеквестрина способна связать 43 иона Ca^{2+} . Этот белок служит основным Ca^{2+} -буфером в СР. В скелетных мышцах кальсеквестрин находится только в терминальных цистернах, в непосредственной близости к рианодин-чувствительному Ca^{2+} -каналу (Pietrobon et al., 1990). Локализация кальсеквестрина объясняется его функцией: белок не только служит буфером для Ca^{2+} внутри терминальных цистерн, но и концентрирует Ca^{2+} около Ca^{2+} -каналов, увеличивая тем самым скорость освобождения Ca^{2+} .

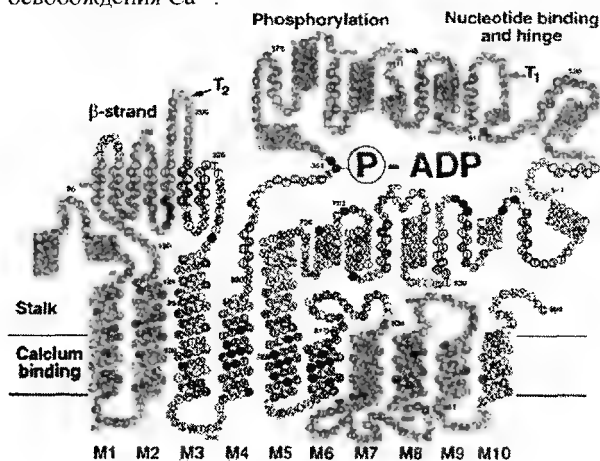


Рис. 24. Топология Ca^{2+} -АТФазы в мембране саркоплазматического ретикулума.

Трансмембранный домен белка включает 10 α -спиральных сегментов (M1-M10). В цитоплазме локализованы домены, участвующие в фосфорилировании (phosphorylation) и связывании нуклеотидов (nucleotide binding). В связывании Ca^{2+} участвуют трансмембранные сегменты M4, M5 и M6 (по Mac Lennan et al., 1997).

5.2.1.1. Биофизические характеристики и регуляция рианодин-чувствительных Ca^{2+} -каналов

Ca^{2+} -каналы в мембранах терминальных цистерн, специфически связывающие растительный алкалоид рианодин, служат объектом интенсивных исследований. Выяснение электрофизиологических и биохимических характеристик этих Ca^{2+} -каналов важно для понимания

связи между возбуждением и сокращением в мышцах. Алкалоид рианодин в концентрации 5-50 нМ увеличивает вероятность открытого состояния канала выброса Ca^{2+} , а в микромолярных концентрациях блокирует канал (Bull et al., 1989).

Использование метода локальной фиксации потенциала позволило исследовать работу одиночных каналов Ca^{2+} -выброса после слияния пузырьков СР с бислойной липидной мембраной. Ca^{2+} -каналы имеют высокую проводимость для Ca^{2+} (100 пСм) и низкую селективность для двухвалентных ионов по сравнению с одновалентными: $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{K}^{+}}=5$. Ca^{2+} (мкМ), АТФ (мМ) и инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP_3) (мкМ), добавленные со стороны цитоплазмы, увеличивают время открытого состояния каналов в СР скелетных мышц. В результате совместного действия Ca^{2+} и АТФ канал может находиться в открытом состоянии длительное время. Каналу свойственны, по крайней мере, шесть закрытых и шесть открытых состояний, активируемых лигандами (Meissner, 1994).

Ca^{2+} -каналы в мембране СР активируются цитоплазматическим Ca^{2+} (0,5-1,5 мкМ), АТФ (1-5 мМ), кофеином (мМ), IP_3 (мкМ); ингибируются Mg^{2+} (мМ), рутениевым красным (мкМ) и La^{3+} (0,5 мМ) (Meissner, 1994; Xu et al., 1999). Эффективным ингибитором каналов Ca^{2+} -выброса в мембране СР является сфингозин (мкМ), длинноцепочечный аминспирт, входящий в состав сфингомиелина (Sabbadini et al., 1992). Кальмодулин подавляет высвобождение Ca^{2+} из СР и уменьшает время открытого состояния Ca^{2+} -каналов в отсутствие АТФ, что указывает на прямое ингибирующее действие кальмодулина на Ca^{2+} -каналы (Meissner, 1994). Рианодин-чувствительные Ca^{2+} -каналы блокируются также заряженными местными анестетиками и гелотермином, пептидным токсином из яда мексиканской бородастой ящерицы (Tinker, Williams, 1993). Императорксин А, пептидный токсин из яда скорпиона *Pandinus imperator*, прямо связывается с рианодиновым рецептором и активирует канал Ca^{2+} -выброса (Gurrola et al., 1999). В последнее время показано, что рианодин-чувствительные Ca^{2+} -каналы активируются сурамином (Sitsapesan, Williams, 1996; Sitsapesan, 1999).

Активность каналов Ca^{2+} -выброса в СР скелетных мышц регулируется аннексинами, относящимися к семейству Ca^{2+} - и фосфолипид-связывающих белков. Методами иммунофлуоресценции установлена связь аннексина VI (кальцимедина) (мол. масса 67 кДа) с СР. Аннексин VI в концентрации 5-40 нМ существенно изменяет воротные характеристики рианодин-чувствительных Ca^{2+} -каналов, изолированных из СР. Вероятность открытого состояния каналов увеличивается в 2,7 раза, а среднее время открытого состояния - в 82 раза (Hazarika et al., 1991).

В последнее время появились данные о том, что свободные жирные кислоты и их производные модулируют активность Ca^{2+} -каналов

рианодиновых рецепторов в скелетных мышцах. Показано, что такие производные длинноцепочечных жирных кислот, как пальмитоилкарнитин и пальмитоил-CoA, в микромолярных концентрациях стимулируют связывание ^3H -рианодина и активируют каналы Ca^{2+} -выброса в СР скелетных мышц млекопитающих (El Hayek et al., 1993; Meissner, 1994) и птиц (Dumonteil et al., 1993). Этот эффект высокоспецифичен для скелетных мышц: пальмитоилкарнитин не влияет на связывание ^3H -рианодина с СР сердечных мышц собаки. Более того, только длинноцепочечные ацилкарнитины (C_{14} , C_{16} , C_{18}) вызывают освобождение Ca^{2+} из СР и увеличивают время открытого состояния Ca^{2+} -каналов рианодинового рецепторов (El-Hayek et al., 1993; Block, 1994). Предполагают, что пальмитоилкарнитин взаимодействует непосредственно с функционально важным участком Ca^{2+} -канала рианодинового рецептора и модулирует его воротные функции (El-Hayek et al., 1993). Возможно, что производные жирных кислот модулируют активность Ca^{2+} -каналов рианодинового рецепторов при некоторых метаболических нарушениях и патологических состояниях мышц, при которых наблюдается повышение $[\text{Ca}^{2+}]$, (Block, 1994; Meissner, 1994).

Активность Ca^{2+} -каналов рианодинового рецептора модулируется сульфгидрильными реагентами. Показано, что перекись водорода стимулирует освобождение Ca^{2+} из СР, окисляя SH-группы рианодинового рецептора (Favero et al., 1995). Алкилирование SH-групп рианодинового рецептора при действии N-этилмалеимида приводит к активации Ca^{2+} -каналов рианодинового рецептора в мембране СР (Aghdasi et al., 1997; Zhang et al., 1999). Установлено также, что окисление SH-групп белка Ca^{2+} -канала блокирует связывание кальмодулина с рианодиновым рецептором. Предполагают, что кальмодулин может защищать рианодинового рецептора от окислительных модификаций во время окислительного стресса (Zhang et al., 1999). Рианодинового рецепторы из сердца овцы, встроенные в бислойную липидную мембрану, активируются окисляющими реагентами 4,4'-дитиодипиридином и тимеросалом (Eager, Dulhunty, 1998, 1999).

Одиночный канал Ca^{2+} -выброса в клетках сердечной мышцы более чувствителен к Ca^{2+} и менее чувствителен к АТФ, чем канал в скелетных мышцах. Алкалоид рианодин в концентрации 5-50 нМ увеличивает вероятность открытого состояния канала Ca^{2+} -выброса, а в микромолярных концентрациях блокирует канал (Meissner, 1994). На основании исследования селективности каналов Ca^{2+} -выброса для одновалентных и двухвалентных катионов до и после модификации рианодином, предложена следующая модель Ca^{2+} -канала в СР клеток сердца (Lindsay et al., 1994). Каналы проницаемы для одновалентных (K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+), двухвалентных (Ba^{2+} , Sr^{2+}) и органических одновалентных (этиламин, пропаноламин, диэтиламин) катионов. В Ca^{2+} -канале

выделяют следующие участки: за устьем канала, обращенным в полость депо, расположен селективный фильтр радиусом 0,35 нм; гидрофобный участок связывания катионов; в середине поры локализован гидрофильный (содержащий COO^- группы) участок связывания одновалентных и двухвалентных катионов; участок связывания больших органических катионов; устье, обращенное в цитоплазму. Рианодин увеличивает размер селективного фильтра на 0,02-0,03 нм; увеличивает плотность отрицательных зарядов в поре; повышает сродство гидрофильного участка связывания к одновалентным и двухвалентным катионам (Lindsay et al., 1994).

5.2.1.2. Структура рианодинового рецептора

Использование рианодина позволило выделить канал выброса Ca^{2+} из скелетных и сердечных мышц (Lai et al., 1988). Показано, что рианодиновый рецептор, реконструированный в бислойную липидную мембрану, функционирует как канал выброса Ca^{2+} с характеристиками, сходными с таковыми Ca^{2+} -каналов из мембран СР. Данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что рианодиновый рецептор образует гомотетрамерный комплекс (Lai et al., 1988). Трехмерная структура рецептора напоминает четырехлепестковый лист клевера, сходный с описанными ранее структурами типа "ножка", связывающих в мышце цистерны Т-системы и терминальные цистерны.

Методами молекулярного клонирования установлена аминокислотная последовательность рианодинового рецептора из СР скелетных мышц кролика (Takeshima et al., 1989) и человека (Zorzato et al., 1990), а также сердечных мышц кролика (Otsu et al., 1990). Наиболее изученным является рианодиновый рецептор из скелетных мышц кролика. Каждая из четырех субъединиц этого рецептора состоит из 5037 аминокислотных остатков (общая мол. масса 565 кДа) (рис 25). Показано, что только 500 аминокислот с С-конца рецептора являются достаточно гидрофобными для пронизывания мембраны. Четыре предполагаемых трансмембранных сегмента (M1-M4), выделяемых в этой области, сходны с пронизывающими мембрану сегментами субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора, что свидетельствует о возможной локализации в этом участке водной поры, образуемой аминокислотными остатками С-концов каждого из мономеров рианодинового рецептора. 90% аминокислот N-конца рецептора являются гидрофильными и образуют, по-видимому, структуру типа "ножка" (Takeshima et al., 1989) (рис. 25). Если рианодиновый рецептор, ножка и канал выброса Ca^{2+} входят в состав одного белка, а дигидропиридиновые рецепторы (Ca^{2+} -каналы) в цистернах Т-системы являются сенсорами напряжения, то, возможно, большой гидрофильный участок (ножка) рианодинового

рецептора непосредственно взаимодействует с цитоплазматическим участком дигидропиридинового рецептора, обеспечивая тем самым электромеханическое сопряжение мембран (Takeshima et al., 1989; Pietrobon et al., 1990) (рис. 26). Таким образом, в скелетных мышцах информация передается по механизму конформационного связывания (conformational coupling) (Klein et al., 1996). Активация дигидропиридинового рецептора приводит к изменению его конформации, которое передается рианодинному рецептору и стимулирует открывание каналов Ca^{2+} -выброса (Berridge, 1993; Clapham, 1995a; Klein et al., 1996)). Обнаружено также, что рианодинный рецептор может посылать ретроградный сигнал, активирующий дигидропириidinный рецептор (Nakai et al., 1996).

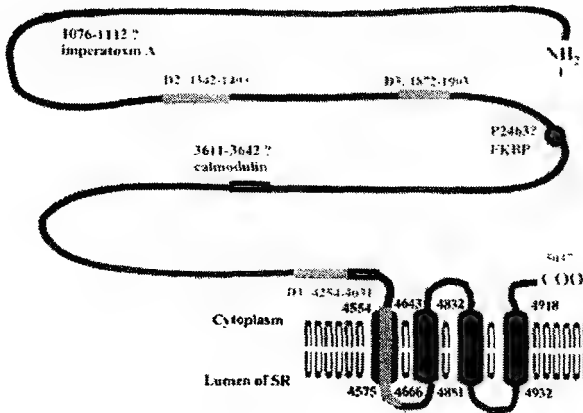


Рис. 25. Топология субъединицы рианодинного рецептора в мембране саркоплазматического ретикулума.

Четыре трансмембранных сегмента локализованы около С-конца молекулы. Участки D1-D3 наиболее вариабельны у трех изоформ рианодинного рецептора. В цитоплазматическом фрагменте рецептора показаны участки связывания императоксина А (imperatoxin A), кальмодулина (calmodulin) и FK-связывающего белка (FKBP).

Cytoplasm – цитоплазма; Lumen of SR – полость саркоплазматического ретикулума (по Stokes, Wagenknecht, 2000).

В сердечных мышцах дигидропириidinный рецептор не взаимодействует непосредственно с рианодинным рецептором и сопряжение между возбуждением и сокращением осуществляется по

механизму Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} (Cannell et al., 1995). Активация дигидропиридинового рецептора приводит к входу Ca^{2+} , который стимулирует рианодин-чувствительные Ca^{2+} -каналы.

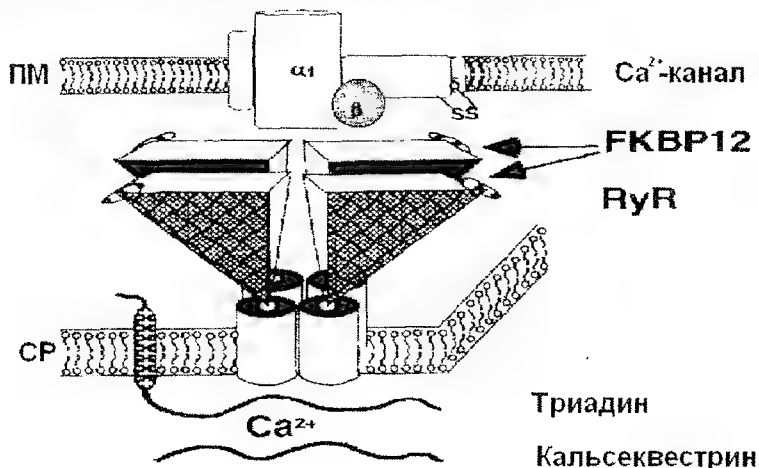


Рис. 26. Модель связи возбуждения и сокращения (excitation-contraction coupling) в скелетных мышцах.

Большой гидрофильный участок (ножка) рианодинового рецептора (RyR) непосредственно взаимодействует с цитоплазматическим участком дигидропиридинового рецептора (Ca^{2+} -канала), обеспечивая тем самым электромеханическое сопряжение мембран. Триадин и кальсеквестрин – белки CP (по Marks, 1997).

Каждая субъединица рианодинового рецептора взаимодействует с FK506-связывающим белком (мол. масса 12 кДа) (Jayaraman et al., 1992; Strigrow, Ehrlich, 1996a; Marks, 1997) (рис. 26). FK506-связывающие белки (FKBPs) представляют собой иммунофилины, которые первоначально были идентифицированы как агенты, связывающие структурно сходные иммунодепрессанты FK506 и рапамицин. По-видимому, FKBPs стабилизируют активность Ca^{2+} -канала рианодинового рецептора (Brillantes et al., 1994). Иммунодепрессанты FK506 и рапамицин вызывают диссоциацию FKBP от рианодинового рецептора и модулируют активность каналов Ca^{2+} -выброса в скелетных и сердечных мышцах. Наблюдается увеличение вероятности открытого состояния и уменьшение проводимости одиночных Ca^{2+} -каналов (Kaftan et al., 1996; Strigrow, Ehrlich, 1996a; Marks, 1997). Рапамицин и FK506 содержат

макроциклическое лактонное кольцо. Обнаружено, что другие соединения (ивермектин, мидекамицин), содержащие макроциклическое лактонное кольцо, также могут прямо активировать рианодиновый рецептор (Ahern et al., 1999).

В настоящее время семейство рианодиновых рецепторов (RYR) включает три изоформы: RYR1, найденный в скелетных мышцах и некоторых нейронах (например, в клетках Пуркинье); RYR2, идентифицированный в сердечных мышцах и мозге; RYR3, найденный в гладких мышцах, мозге и других клетках (Meissner, 1994; Bennett et al., 1996).

5.2.2. Ca^{2+} -депо немышечных клеток

В немышечных клетках кальциевые депо отличаются большей сложностью и разнообразием (Pozzan et al., 1994). IP_3 освобождает Ca^{2+} из немитохондриального пула, сходного с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) (Streb et al., 1983; Berridge, Irvine, 1984; Berridge, 1993). Однако только часть Ca^{2+} -пула немышечных клеток чувствительна к IP_3 ; в среднем IP_3 освобождает примерно 30-50% Ca^{2+} , запасенного в немитохондриальном пуле, а остальная часть Ca^{2+} мобилизуется при действии Ca^{2+} -ионофоров (Berridge, Irvine, 1989). Многие немышечные клетки содержат Ca^{2+} -депо, не чувствительные к IP_3 , но, как и СР мышц, чувствительные к рианодину и кофенину (Berridge, Irvine, 1989; Pozzan et al., 1994).

В последнее время сложилось представление о том, что ключевую роль в генерации и проведении Ca^{2+} -сигналов в невозбудимых клетках играют такие внутриклеточные органеллы, как ЭР, ядро, митохондрии (Pozzan et al., 1994; Meldolesi, Pozzan, 1998; Alvarez et al., 1999; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 2001). Для измерения концентрации Ca^{2+} во внутриклеточных депо используются флуоресцентный Ca^{2+} -зонд Mag-Fura 2-AM и Ca^{2+} -чувствительный белок экворин (Meldolesi, Pozzan, 1998; Alvarez et al., 1999).

Основным IP_3 -чувствительным Ca^{2+} -депо является ЭР или его специализированный субкомпаратмент (кальциосома). ЭР способен накапливать большие концентрации Ca^{2+} и затем быстро освобождать Ca^{2+} в цитозоль (рис. 27). Общая концентрация Ca^{2+} в ЭР составляет 5-10 мМ (Pozzan et al., 1994; Montero et al., 1995; Meldolesi, Pozzan, 1998). Большая часть Ca^{2+} в ЭР связана с кальретикулином и другими Ca^{2+} -связывающими белками. Концентрация свободного Ca^{2+} в полости ЭР различных типов клеток в состоянии покоя составляет 300-800 мкМ (Alonso et al., 1998; Alvarez et al., 1999). Прямое измерение концентрации

Ca^{2+} в ЭР позволило оценить скорости выхода Ca^{2+} из депо и восполнения ЭР (Barrero et al., 1997; Mogami et al., 1998; Alvarez et al., 1999).

Обнаружено также, что Ca^{2+} играет решающую роль во многих процессах, протекающих в ядре: транскрипции генов, синтезе ДНК, разрушении и репарации ядерной мембраны (Berridge, 1995b; Gerasimenko et al., 1996; Santella, 1996). Использование экворина показало, что концентрация Ca^{2+} в нуклеоплазме в покое близка к концентрации Ca^{2+} в цитозоле (100-200 нМ) (Petersen, 1996). После стимуляции клеток Ca^{2+} быстро диффундирует из цитозоля в ядро через ядерные поры. Увеличение концентрации Ca^{2+} в ядре происходит через 50-300 мс после повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Allbritton et al., 1994). Ядерная оболочка является продолжением ЭР, способна аккумулировать Ca^{2+} и затем освобождать его в ответ на воздействие IP_3 (рис. 27). Установлено, что Ca^{2+} -АТФазы локализованы в наружной ядерной мембране, а IP_3 -чувствительные Ca^{2+} -каналы - во внутренней ядерной мембране (Gerasimenko et al., 1996). Предполагают, что IP_3 -рецепторы в ядре могут активироваться IP_3 , образующимся в самом ядре в результате стимуляции эндогенного фосфоинозитидного цикла (Berridge, 1995b).

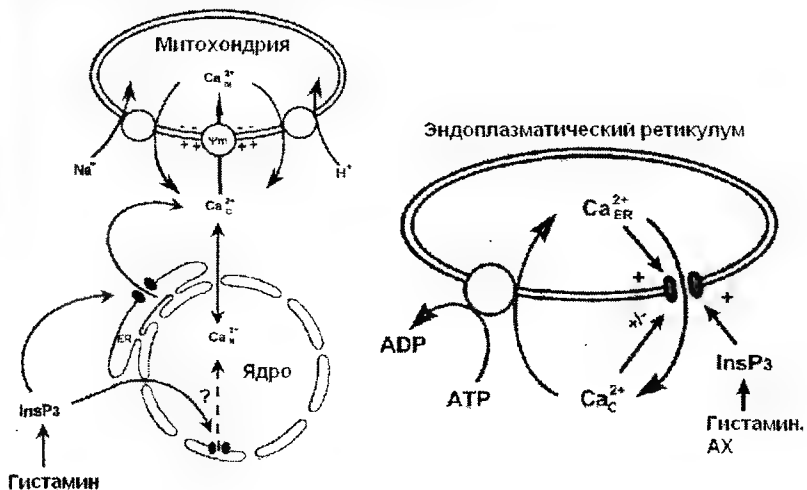


Рис. 27. Перераспределение Ca^{2+} в митохондриях, ядре и эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) при стимуляции клетки IP_3 -мобилизирующими агонистами (гистамин, ацетилхолин (АХ)) (по Alvarez et al., 1999).

Инкубация клеток HeLa в бескальциевой среде способствует быстрому уменьшению концентрации Ca^{2+} в ЭР в течение 3 мин при 37 °C или в течение 12 мин при 22 °C. Ингибирование Ca^{2+} -АТФаз уменьшает время опустошения депо до 1-2 мин (Barrero et al., 1997). Полное восполнение ЭР после добавления Ca^{2+} в наружную среду происходит в различных типах клеток за 2-3 мин при 37 °C и за 5-8 мин при 22 °C (Barrero et al., 1997; Alonso et al., 1998; Mogami et al., 1998; Alvarez et al., 1999).

В последние годы возобновился интерес исследователей к выяснению роли митохондрий в процессах Ca^{2+} -сигналикации. Учитывая, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]$ может стимулировать активность ключевых ферментов митохондрий, предполагают, что обратимый захват Ca^{2+} митохондриями может координировать продукцию энергии в клетке (Gunter et al., 1994). Относительно недавно разработаны новые флуоресцентные Ca^{2+} -зонды (RHOD 2 и др.), которые можно вводить избирательно в митохондрии живых клеток, и проводить одновременную регистрацию изменений концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле и в митохондриях. Установлено, что концентрация Ca^{2+} в митохондриях в покое соответствует таковой в цитозоле (Rizzuto et al., 1998). Для некоторых типов клеток было показано, что митохондрии являются активными участниками внутриклеточной Ca^{2+} -сигналикации, уникальная роль которых определяется способностью митохондрий быстро аккумулировать и затем освобождать большие концентрации Ca^{2+} (Robb-Gaspers et al., 1998; Ricken et al., 1998; Duchen, 1999; Drummond et al., 2000). Так, оказалось, что митохондрии могут захватывать Ca^{2+} из микродоменов с локально высокой концентрацией Ca^{2+} в цитозоле, связанной с входом Ca^{2+} из наружной среды или мобилизацией Ca^{2+} из депо (Rizzuto et al., 1993, 1994, 1998; Rutter et al., 1993; Lawrie et al., 1996; Babcock et al., 1997; Babcock, Hille, 1998). Ранее на клетках асцитной карциномы Эрлиха было показано, что при активации АТФ-рецептора этих клеток митохондрии временно захватывают 25-30% выходящего из ЭР Ca^{2+} . При этом меняется активность некоторых ферментов окислительного фосфорилирования. Выход Ca^{2+} из митохондрий интактных клеток подавляется тетрафенилфосфонием (Gukovskaya, Zinchenko, 1990).

Интересно, что распределение митохондрий в клетке далеко не случайно и связано с ее метаболическими потребностями. Например, в эндотелиальных клетках линии ECV304 менее 4%, а в клетках линии HeLa 65% митохондрий расположены на расстоянии 700 нм от ЭР. В то же время, в клетках ECV304 14%, а в клетках HeLa менее 6% митохондрий находятся на расстоянии 700 нм от плазматической мембраны (Lawrie et al., 1996). В клетках HeLa митохондрии образуют

большую взаимосвязанную тубулярную сеть, имеющую многочисленные тесные контакты с ЭР (Rizzuto et al., 1998). Функциональным следствием этой анатомической организации является то, что при освобождении Ca^{2+} из ЭР, концентрация Ca^{2+} вблизи митохондрий существенно выше, чем в цитозоле (Rizzuto et al., 1998). В гладкомышечных клетках (McCarton, Muir, 1999), кардиомиоцитах и астроцитах (Duchen, 1999) митохондрии также расположены в непосредственной близости к ЭР/СР.

Следует специально отметить серию работ Хилле и соавторов (Herrington et al., 1996; Park et al., 1996; Babcock et al., 1997; Babcock, Hille, 1998) на хромаффинных клетках надпочечника крысы. Одновременное измерение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и концентрации Ca^{2+} в митохондриях показало, что даже средние увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызывают быстрые кратковременные перераспределения Ca^{2+} из цитозоля в митохондрии. Обнаружено также, что захват Ca^{2+} митохондриями ограничивает подъем и определяет быстрый спад Ca^{2+} -сигналов, вызванных входом Ca^{2+} в клетку или мобилизацией Ca^{2+} из депо. Последующий экспорт Ca^{2+} из митохондрий происходит с участием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника во внутренней мембране митохондрий и может замедлить спад Ca^{2+} -сигналов в цитозоле и способствовать восполнению Ca^{2+} -депо. Авторы предполагают, что митохондрии играют активную и уникальную роль в процессах Ca^{2+} -сигнализации в хромаффинных клетках крысы. Плазматическая мембрана и внутриклеточные Ca^{2+} -депо быстро доставляют Ca^{2+} в цитоплазму, открывая ионные каналы, и затем медленно удаляют его с помощью процессов первичного (Ca^{2+} -АТФ-аза) и вторичного активного транспорта ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен). Напротив, митохондрии в соответствии с их происхождением как симбионтов внутри цитоплазмы эукариот быстро удаляют Ca^{2+} из цитозоля с помощью Ca^{2+} -унипортера, который действует как канал во внутренней мембране митохондрий, и затем более медленно экспортируют Ca^{2+} в цитозоль с участием вторично-активного транспорта ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника) (рис. 27). Таким образом, плазматическая мембрана и внутриклеточные депо создают короткоживущие микродомены с высокой концентрацией Ca^{2+} . Митохондрии, с другой стороны, захватывают этот Ca^{2+} и затем медленно возвращают его в цитоплазму, где он может активировать Ca^{2+} -зависимые процессы и, возможно, способствовать восполнению Ca^{2+} -депо (Babcock et al., 1997; Babcock, Hille, 1998).

Перечисленные выше данные Хилле и соавторов, полученные на хромаффинных клетках крысы, были подтверждены на хромаффинных клетках быка (Xu et al., 1997). Оказалось, что и в этих клетках митохондрии играют быструю и доминирующую роль в удалении больших количеств Ca^{2+} из цитоплазмы. Так, показано, что митохондрии в интактной клетке могут захватывать до 1 мМ внутриклеточного Ca^{2+} , что для клетки размером 1 мкм соответствует Ca^{2+} -току в 250 пА/с через

Ca^{2+} -каналы (Xu et al., 1997). В некоторых клетках этот кратковременный захват Ca^{2+} митохондриями может быть важным для генерации Ca^{2+} волн и осцилляций (Jouaville et al., 1995; Nehl et al., 1996). Кроме того, кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} в митохондриях может, по-видимому, стимулировать продукцию АТФ в митохондриях.

В последнее время установлена важная роль митохондрий в регуляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках гладких мышц. Так, на гладкомышечных клетках легочной артерии крысы показано, что освобождение Ca^{2+} из СР, вызванное АТФ или кофеином, приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоле и в митохондриях. Концентрация Ca^{2+} в митохондриях повышается после увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и остается повышенной в течение значительного времени после возвращения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ к базальному уровню (Drummond, Tuft, 1999). В гладкомышечных клетках морской свинки митохондрии также регулируют освобождение Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо. Карбонилцианид m-хлорофенилгидразон (СССР), предотвращающий захват Ca^{2+} митохондриями, существенно уменьшает амплитуду IP_3 -индуцируемых Ca^{2+} -сигналов. Предполагают, что после IP_3 -индуцированного освобождения Ca^{2+} , аккумуляция Ca^{2+} митохондриями может способствовать поддержанию низкой локальной $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в области IP_3 -рецептора и предотвращать его Ca^{2+} -зависимую инактивацию (McCarron, Muir, 1999).

Недавно установлено, что аппарат Гольджи также является IP_3 -чувствительным Ca^{2+} -депо, функциональные характеристики которого отличаются от таковых ЭР. В покоящихся клетках линии HeLa концентрация Ca^{2+} в полости аппарата Гольджи составляет 0,3 мМ. При активации клеток гистамином, индуцирующим образование IP_3 , наблюдается быстрое уменьшение концентрации Ca^{2+} в полости аппарата Гольджи (Pinton et al., 1998).

Кальциевые депо в немышечных клетках содержат Ca^{2+} -АТФазу, сходную, но не идентичную АТФазе в СР. Ca^{2+} -АТФаза в немышечных клетках является продуктом гена SERCA 3 (Pozzan et al., 1994; Hussain, Inesi, 1999). Кроме того, предполагают, что IP_3 -чувствительное депо может аккумулировать Ca^{2+} путем совместной работы H^+ -АТФазы и $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (Pietrobon et al., 1990).

Буферную роль в кальциевых депо немышечных клеток играет Ca^{2+} -связывающий белок, известный как кальрегулин или кальретикулин (гликопротеин, мол. масса 47 кДа). В отличие от кальсеквестрина кальретикулин имеет один участок, связывающий Ca^{2+} с высоким сродством. Кальретикулин из печени крыс (кроме связывающего участка с высоким сродством) связывает с низким сродством до 50 молей Ca^{2+} на 1 моль белка (Treves et al., 1990).

5.2.2.1. Структура IP_3 -рецептора

Предполагают, что высвобождение Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо происходит после связывания IP_3 с белком, одновременно являющимся рецептором для IP_3 и каналом, обеспечивающим выход Ca^{2+} из полости депо в цитоплазму (Berridge, 1993; Marshall, Taylor, 1993; Bezprozvanny, Ehrlich, 1995; Marks, 1997).

От момента обнаружения того факта, что IP_3 индуцирует освобождение Ca^{2+} из немитохондриального депо (Streb et al., 1983), до выделения IP_3 -рецептора (Supattapone et al., 1988b) прошло 5 лет. Это связано с тем, что IP_3 -рецепторы в большинстве клеток имеют низкую плотность. Удачной находкой оказались клетки Пуркинье мозжечка, которые имеют необычайно высокую плотность IP_3 -рецепторов. IP_3 -рецептор был выделен из мозжечка быка, крысы и мыши и реконструирован в липосомы (Supattapone et al., 1988b; Marshall, Taylor, 1993; Bezprozvanny, Ehrlich, 1995). Методами молекулярного клонирования установлено, что IP_3 -рецептор гомологичен рианодинному рецептору, каналу выброса Ca^{2+} из СР скелетных мышц. IP_3 -рецептор представляет собой белок с мол. массой 313 кДа, имеющий 6 трансмембранных участков в области С-конца (Furuichi et al., 1989; Mignery et al., 1990; Galvan et al., 1999). Первые два трансмембранных сегмента необходимы для встраивания рецептора в мембрану (Galvan et al., 1999).

Аминокислотная последовательность IP_3 -рецептора высококонсервативна, из 2749 аминокислотных остатков выявлено различие между белками мыши и крысы только в 21 аминокислоте (Mignery et al., 1990). Использование различных моноклональных антител показало, что N-конец белка IP_3 -рецептора обращен в цитоплазму, а С-конец расположен в полости депо (Furuichi et al., 1989). Белок имеет многочисленные потенциальные участки гликозилирования и по крайней мере два потенциальных участка фосфорилирования цАМФ-зависимой киназой (Furuichi et al., 1989). Показано, что связывание IP_3 с очищенным IP_3 -рецептором ингибируется гепарином (Supattapone et al., 1988b) и высокочувствительно к pH и концентрации цитоплазматического Ca^{2+} (Pietrobon et al., 1990). Установлено, что IP_3 -рецептор не только гомологичен рианодинному рецептору в области трансмембранных сегментов, но, так же как и рианодинный рецептор, образует гомотетрамеры из четырех нековалентно связанных высококонсервативных субъединиц (мол. масса 313 кДа) (Mignery et al., 1990; Marshall, Taylor, 1993; Galvan et al., 1999).

Методами направленного мутагенеза исследовали домены IP_3 -рецептора, необходимые для связывания лигандов и тетрамеризации рецептора (Mignery, Sudhof, 1990). Делеция трансмембранных участков с

С-конца IP_3 -рецептора мозжечка приводила к синтезу растворимого рецепторного белка, который эффективно связывал IP_3 , но не образовывал тетрамеры, а оставался мономерным. Это свидетельствует о том, что трансмембранные участки важны для объединения субъединиц рецептора в тетрамеры и образуют, по-видимому, канал выброса Ca^{2+} . Показано, что для олигомеризации рецептора особую значимость имеют пятый и шестой трансмембранные участки (Galvan et al., 1999).

Обнаружено также, что в образовании поры Ca^{2+} -канала принимает участие последовательность из 190 аминокислот (включающая пятый и шестой трансмембранные сегменты) в области С-конца IP_3 -рецептора (Ramos-Franco et al., 1999). Напротив, участок связывания IP_3 расположен на N-конце рецептора, содержащем много остатков аргинина и лизина. Таким образом, каждая субъединица гомотетрамера IP_3 -рецептора содержит независимый лигандсвязывающий участок, локализованный на N-конце каждой субъединицы и отделенный от образующих Ca^{2+} -канал трансмембранных участков более чем 1400 аминокислотами.

После связывания IP_3 происходит значительная конформационная перестройка рецептора, приводящая к активации канала. По доменной модели IP_3 -рецептора субъединицы рецептора взаимодействуют с помощью нековалентных связей субъединиц в области С-концов, содержащих трансмембранные фрагменты. Эти фрагменты в большой степени гомологичны риадиноновому рецептору и образуют, по-видимому, управляемый Ca^{2+} -канал. Аминокислотная последовательность между IP_3 -связывающим доменом и Ca^{2+} -каналом служит мишенью для регуляторных факторов, так как участок цАМФ-зависимого фосфорилирования рецептора расположен, по-видимому, в этой области. Предполагают, что участками фосфорилирования IP_3 -рецептора цАМФ-зависимой протеинкиназой являются остатки серина в положениях 1755 и 1589 (Mignery, Sudhof, 1990).

В настоящее время семейство IP_3 -рецепторов включает три изоформы. Наиболее распространенной изоформой является IP_3 -рецептор 1 типа, который идентифицирован в мозге (мозжечке), гладких и скелетных мышцах, Т-лимфоцитах, клетках сердца, ооцитах *Xenopus*. IP_3 -рецептор 2 типа клонирован из мозжечка крысы; его аминокислотная последовательность на 69 % идентична таковой IP_3 -рецептора 1 типа. IP_3 -рецептор 3 типа экспрессирован в эпителии кишечника и на 64 % идентичен по аминокислотной последовательности IP_3 -рецептору 1 типа (Marshall, Taylor, 1993; Bezprozvanny, Ehrlich, 1995; Marks, 1997).

5.2.2.2. Регуляция активности IP_3 -рецептора

IP_3 -рецепторы являются мишенями для многих аллостерических регуляторов: протеинкиназ, адениновых нуклеотидов, двухвалентных катионов, связанных белков.

Наиболее эффективным из известных агонистов (активаторов) IP_3 -рецепторов является аденофостин А, выделяемый из *Penicillium brevicompactum*. Сродство аденофостина А к IP_3 -рецептору в 100 раз выше, чем у самого IP_3 (DeLisle et al., 1997).

Ингибиторами IP_3 -рецепторов служат гепарин (Supattapone et al., 1988b), кофеин (Missiaen et al., 1992a, 1992b) и этанол (Berridge, 1993). Mg^{2+} ингибирует как связывание IP_3 с рецептором, так и IP_3 -индуцированный выброс Ca^{2+} (Marshall, Taylor, 1993). В последнее время обнаружено, что эффективным ингибитором IP_3 -рецепторов является проникающий через мембрану ксестоспонгин С (xestospongин С) (Gafni et al., 1997).

Выделенный из мозжечка IP_3 -рецептор может быть фосфорилирован цАМФ-зависимой протеинкиназой, протеинкиназой С и Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназой 2 (Marshall, Taylor, 1993). Эти ферменты фосфорилируют IP_3 -рецептор, добавляя один фосфатный остаток на молекулу белка. Фосфорилирующая активность трех протеинкиназ аддитивна: в присутствии смеси протеинкиназ IP_3 -рецептор получает три фосфатных остатка. Два потенциальных участка фосфорилирования протеинкиназой А обнаружены в IP_3 -рецепторах 1 и 2 типа (Mignery et al., 1990; Marshall, Taylor, 1993). В одних типах клеток протеинкиназа А потенцирует IP_3 -стимулируемый выброс Ca^{2+} , в то время как в других типах клеток фосфорилирование IP_3 -рецептора протеинкиназой А ингибирует Ca^{2+} -каналы (Supattapone et al., 1988a; Marshall, Taylor, 1993; Tertyshnikova, Fein, 1998). Фосфорилирование протеинкиназой С IP_3 -рецепторов, локализованных в ядре, ускоряет IP_3 -чувствительный выброс Ca^{2+} (Matter et al., 1993). Обнаружено, что IP_3 -рецептор фосфорилируется также цГМФ-зависимой протеинкиназой (Komalavilas, Lincoln, 1994, 1996).

В структуре IP_3 -рецептора 1 типа идентифицированы два участка фосфорилирования по тирозину: один (Tyr-482) расположен около N-конца, а другой (Tyr-2617) - около предполагаемой поры Ca^{2+} -канала в области С-конца рецептора. Показано, что при активации Т-лимфоцитов происходит фосфорилирование IP_3 -рецепторов по остаткам тирозина, что может играть роль в модуляции активности IP_3 -чувствительных каналов Ca^{2+} -выброса (Harnick et al., 1995; Jayaraman et al., 1996; Marks, 1997). Обнаружено, что антиген-специфическая стимуляция рецепторного комплекса Т-клеток вызывает ассоциацию нереперторной тирозинкиназы

Гуп с IP_3 -рецептором, фосфорилирование по тирозину IP_3 -рецептора и увеличение вероятности открытого состояния каналов Ca^{2+} -выброса (Jayaraman et al., 1996; Marks, 1997).

На функционирование IP_3 -рецептора оказывают влияние адениновые нуклеотиды. В настоящее время показано, что АТФ регулирует активность IP_3 -рецепторов двояким образом. В малых концентрациях (10-500 мкМ) АТФ увеличивает связывание IP_3 с рецептором и выброс Ca^{2+} , в то время как в более высоких концентрациях (>500 мкМ), АТФ ингибирует как связывание IP_3 , так и IP_3 -чувствительный выброс Ca^{2+} (Marshall, Taylor, 1993). Стимулирующее действие АТФ имитируется другими адениновыми нуклеотидами (АДФ, АМФ), но не ГТФ. В связывающем домене IP_3 -рецептора из мозжечка идентифицированы 2 потенциальных участка связывания адениновых нуклеотидов (аминокислоты 2016-2021) (Furuichi et al., 1989; Mignery et al., 1990). Сродство связывающих участков к АТФ выше, чем к АДФ, и намного выше, чем к АМФ. Взаимодействие АТФ с этими участками связывания определяет стимулирующее действие АТФ на IP_3 -рецептор. Ингибирующее влияние АТФ опосредовано конкуренцией между АТФ и IP_3 за взаимодействие с IP_3 -связывающим участком на рецепторе (Marshall, Taylor, 1993).

Связывание IP_3 с рецептором и IP_3 -индуцируемый выброс Ca^{2+} увеличиваются при щелочных значениях pH (7,5-9). Показано, что это связано с повышением сродства IP_3 -рецептора к лиганду (Marshall, Taylor, 1993).

Активность IP_3 -рецептора модулируется сульфгидрильными реагентами. Обнаружено, что тимеросал и окисленный глутатион повышают чувствительность IP_3 -рецептора к IP_3 и способствуют мобилизации Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо (Missiaen et al., 1991; Hilly et al., 1993; Bird et al., 1993; Parekh, Penner, 1995). Окисляющий агент 2,2-дитиодипиридин вызывает мобилизацию Ca^{2+} из депо, активируя IP_3 -рецепторы в β -клетках поджелудочной железы (Islam et al., 1997). Фениларзин-оксид, ковалентно связывающийся с соседними SH-группами белков, индуцирует мобилизацию Ca^{2+} из депо в перитонеальных макрофагах крысы и фибробластах человека (Крутецкая и др., 1997). Перекись водорода и тимеросал, окисляющие SH-группы белка IP_3 -рецептора, существенно повышают активность IP_3 -чувствительного канала Ca^{2+} -выброса (Kaplin et al., 1994).

Активность IP_3 -рецепторов модулируется также свободными жирными кислотами. Показано, что арахидоновая кислота и другие полиненасыщенные жирные кислоты вызывают мобилизацию Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных Ca^{2+} -депо в β -клетках поджелудочной железы (Wolf et al., 1986; Ramanadham et al., 1992) и Т-клетках линии Jurkat (Chow, Jondal, 1990). В то же время, в литературе имеются данные о том, что

внеклеточная арахидоновая кислота ингибирует IP_3 -чувствительные каналы Ca^{2+} -выброса. Так, на ацинарных клетках поджелудочной железы крысы показано, что арахидоновая кислота (10-100 мкМ) ингибирует мобилизацию Ca^{2+} , индуцируемую ацетилхолином или IP_3 (Matsuura, 1990, 1993). В экспериментах по встраиванию выделенных рецепторов в искусственные мембраны установлено также, что каналы IP_3 -рецептора ингибируются арахидоновой кислотой (10 мкМ), в то время как каналы риаинодинового рецептора не чувствительны к арахидоновой кислоте (100 мкМ), но активируются лейкотриеном B_4 (Striggo, Ehrlich, 1997).

Зависимость IP_3 -индуцированного выброса Ca^{2+} от $[Ca^{2+}]_i$ имеет колоколообразный вид с оптимальной концентрацией Ca^{2+} , равной 600 нМ (Bezprozvanny et al., 1991; Finch et al., 1991; Bezprozvanny, Ehrlich, 1995). По-видимому, существуют положительные и отрицательные обратные связи, определяющие сложную регуляцию формирования Ca^{2+} -сигнала в клетках (Bezprozvanny, Ehrlich, 1995). Положительные и отрицательные обратные связи обеспечивают освобождение Ca^{2+} , достаточного для формирования полноценного Ca^{2+} -сигнала, предотвращая чрезмерное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, опасное для клеток. Чувствительность IP_3 -рецептора к IP_3 также имеет бифазный характер: максимальная чувствительность соответствует физиологическим концентрациям IP_3 (0,5-1 мкМ) (Clapham, 1995a).

Данные о регуляции IP_3 -чувствительных Ca^{2+} -каналов в ЭР люминальным Ca^{2+} (Ca^{2+} в полости депо) весьма противоречивы. Так, на клетках гладких мышц показано, что IP_3 -индуцируемый выброс Ca^{2+} значительно снижается, если депо были предварительно опустошены (Missiaen et al., 1992a, 1992b). Напротив, по данным Шатлворта (Shuttleworth, 1992), IP_3 -чувствительный выброс Ca^{2+} не модулируется интралюминальным Ca^{2+} . С помощью метода локальной фиксации потенциала показано, что повышение концентрации Ca^{2+} в полости депо ингибирует активность IP_3 -чувствительных Ca^{2+} -каналов в мембране ЭР. Наблюдается уменьшение вероятности открытого состояния и времени жизни каналов в открытом состоянии (Bezprozvanny, Ehrlich, 1994).

Активность IP_3 -рецепторов, так же как и риаинодиновых рецепторов, модулируется FK 506-связывающими белками (мол. масса 12 кДа) (Cameron et al., 1995; Striggo, Ehrlich, 1996a).

5.2.2.3. Биофизические характеристики IP_3 -чувствительных каналов Ca^{2+} -выброса

В настоящее время достаточно хорошо изучены биофизические характеристики IP_3 -активируемых Ca^{2+} -каналов из ЭР клеток Пуркинье мозжечка и ядерной оболочки ооцитов Хепорус.

В мембранных везикулах ЭР мозжечка собаки, встроенных в бислойные мембраны, методом локальной фиксации потенциала выявлены IP_3 -активируемые Ca^{2+} -каналы (Bezprozvanny et al., 1991; Watras et al., 1991). Они активируются при приложении IP_3 (2 мкМ) с цитоплазматической стороны и имеют четыре проводящих подсостояния с проводимостями 20, 40, 60, 80 пСм. IP_3 -чувствительные Ca^{2+} -каналы активируются дополнительно адениновыми нуклеотидами (АМФ, АТФ). Для открывания канала достаточно связывания одной молекулы IP_3 и одной молекулы нуклеотида. Активность канала зависит от концентрации свободного цитоплазматического Ca^{2+} . Оптимальная концентрация Ca^{2+} для работы канала - 0,2 мкМ. Каналы блокируются гепарином. Канал IP_3 -рецептора более проницаем для Ba^{2+} , чем для Ca^{2+} , и не проницаем для $Tris^+$. Четыре подсостояния проводимости канала можно объяснить, по-видимому, тетрамерной структурой белкового комплекса IP_3 -рецептора. Возможно, тетрамерной структуре IP_3 -рецептора соответствуют четыре Ca^{2+} -канала (с проводимостью 20 пСм каждый) в составе одного белкового комплекса. Кроме IP_3 -активируемых Ca^{2+} -каналов, в ЭР мозжечка идентифицированы также Ca^{2+} -активируемые Ca^{2+} -каналы, связанные с рианодиновым рецептором и чувствительные к рианодину. Проводимость этих каналов 50 пСм. Каналы активируются кофенином (5 мМ) и блокируются рутениевым красным (2 мкМ) (Bezprozvanny et al., 1991; Watras et al., 1991).

IP_3 -рецептор из мозжечка мыши, встроенный в бислойную липидную мембрану, образует Ca^{2+} -селективные каналы. Они активируются при добавлении IP_3 (4,8 мкМ) с цитоплазматической стороны. Каналы проницаемы для Ca^{2+} (проводимость 26 пСм) и Na^+ (проводимость 21 пСм); отношения проницаемостей $P_{Ca^{2+}}/P_{Tris^+} = 6,3$ и $P_{Na^+}/P_{Cl^-} = 5,4$. Канал имеет несколько проводящих подсостояний. При добавлении АТФ (в присутствии IP_3) IP_3 -активируемые Ca^{2+} -каналы переходят на более проводящие подсостояния (Maeda et al., 1991).

Ряд селективности IP_3 -чувствительных Ca^{2+} -каналов из клеток мозжечка имеет вид: $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Mn^{2+} > K^+$. Проводимости каналов для этих катионов составляют (пСм): Ba^{2+} (85) $> Sr^{2+}$ (77) $> Ca^{2+}$ (53) $> Mg^{2+}$ (42) (Bezprozvanny, Ehrlich, 1994). Канал проницаем также для ионов Mn^{2+} ; проводимость канала для Mn^{2+} составляет 17 пСм (Striggow, Ehrlich, 1996b).

IP_3 -чувствительные Ca^{2+} -каналы из ядерной оболочки ооцитов *Xenopus* также имеют слабую селективность для двухвалентных катионов по отношению к одновалентным: $P_{Ca^{2+}}/P_{K^+} = 8$. Проводимость канала для Ca^{2+} составляет 50 пСм. Канал имеет 3 подуровня проводимости (Mak, Foscett, 1994; Parys, Bezprozvanny, 1995).

Таким образом, выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо (СР или ЭР) в ответ на возбуждение клетки может происходить в результате

открывания Ca^{2+} -активируемого Ca^{2+} -канала (рианодинового рецептора) или IP_3 -активируемого Ca^{2+} -канала (IP_3 -рецептора).

5.3. Механизмы входа Ca^{2+} в клетки

Ионы кальция необходимы для жизнедеятельности практически всех животных и растительных организмов. Многие агонисты рецепторов кроме мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо вызывают также вход Ca^{2+} в клетку из наружной среды. Поступление ионов кальция в клетку происходит, главным образом, по кальциевым каналам. Выделяют два класса кальциевых каналов: потенциал-зависимые и рецептор-управляемые. Рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы связаны с мембранными рецепторами, взаимодействующими в основном с нейромедиаторами и гормонами.

5.3.1. Типы и структурно-функциональная организация потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы идентифицированы в плазматической мембране клеток, обладающих электрической возбудимостью, в частности клеток сердечной мышцы, гладкомышечных, эндокринных, нервных клеток, скелетных мышечных волокон, клеток электрорецепторов скатов и т.д. (Ходоров, 1975; Костюк, 1986; Hille, 1992; см. кн. Крутецкая, Лонский, 1994; Крутецкая, Лебедев, 2000б; Hille, 2001).

Кинетика всех Ca^{2+} -каналов сходна с таковой потенциал-зависимых Na^+ - и K^+ -каналов. Ca^{2+} -каналы активируются при деполяризации и затем инактивируются. Однако при одинаковой температуре постоянные времени активации (τ_m) и инактивации (τ_h) для Ca^{2+} -каналов в 50 раз больше, чем для Na^+ -каналов. Инактивация Ca^{2+} -каналов более сложная, чем Na^+ -каналов. В дополнение к потенциал-зависимой инактивации в некоторых клетках обнаружена Ca^{2+} -зависимая инактивация, возникающая в результате повышения $[\text{Ca}^{2+}]$, во время деполяризующего импульса (Hille, 1992, 2001).

Многие двухвалентные ионы подавляют токи через Ca^{2+} -каналы (Hille, 1992; см. обз. Spedding, Paoletti, 1992; Mori et al., 1996; Hille, 2001). В основе такого действия лежит конкурентное связывание Ca^{2+} -каналом блокирующих ионов. Весьма эффективно конкурируют с ионами Ca^{2+} ионы La^{3+} . По способности связываться с Ca^{2+} -каналами мембраны мышечных волокон морского желудка катионы располагаются следующим образом: $\text{La}^{3+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Co}^{2+} = \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ (Hagiwara,

Takahashi, 1967). Катионы Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} и Mn^{2+} широко используют в качестве блокаторов Ca^{2+} -каналов.

Идентифицировано значительное число органических блокаторов Ca^{2+} -каналов, называемых антагонистами Ca^{2+} -каналов (Hille, 1992; Spedding, Paoletti, 1992; Mori et al., 1996; см. кн. Крутецкая, Лебедев, 2000б; Hille, 2001). Ca^{2+} -антагонисты - липофильные азотсодержащие соединения - представлены веществами трех химических групп. Первую группу составляют производные фенилалкиламина (верапамил, галлопамил, Д-600), вторую - производные 1,4-дигидропиридинов (нифедипин, никардипин, нитрендипин, нимодипин), третью - производные бензотиазепина (дилтиазем, клентиазем). Антагонисты Ca^{2+} -каналов широко используют в клинике как антиаритмические и сосудорасширяющие средства. Антагонисты Ca^{2+} -каналов предпочтительно действуют на Ca^{2+} -каналы L-типа, что отличает их от каналов других типов. Однако при высоких концентрациях эти блокаторы также ингибируют Na^{+} - и K^{+} -каналы, т.е. они не абсолютно специфичны к Ca^{2+} -каналам.

Эффект фенилалкиламинов (верапамил, Д-600) сходен с действием местных анестетиков. Блокирование Ca^{2+} -каналов этими агентами зависит от частоты следования деполяризующих импульсов (Hille, 1992; Hering et al., 1997). Четвертичные производные Д-600 действуют с внутренней поверхности мембраны и достигают рецепторного участка, только когда ворота открыты. По-видимому, ворота Ca^{2+} -канала (так же как Na^{+} - и K^{+} -каналов) расположены на внутренней стороне мембраны. Далее находится широкое устье с гидрофобным связывающим участком.

Выявлены также агонисты Ca^{2+} -каналов. Например, Bay K 8644 и CGP 28392, производные 1,4-дигидропиридина, вызывают увеличение кальциевых токов (Mori et al., 1996).

На основании электрофизиологических и фармакологических исследований выделяют следующие типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов: L, T, N, P, Q и R, различающиеся пороговыми уровнями активации, временем жизни в открытом состоянии, скоростью инактивации, величиной элементарной проводимости и фармакологическими свойствами (Dascal, 1990; Hille, 1992; Spedding, Paoletti, 1992; Hofmann et al., 1994; см. кн. Крутецкая, Лонский, 1994; Catterall, 1996; Mori et al., 1996; Randall, 1998; см. кн. Крутецкая, Лебедев, 2000б; Catterall, 2000; Hille, 2001). В последнее время предложена новая классификация потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, в соответствии с которой выделяют три семейства Ca^{2+} -каналов (Ca_1 , Ca_2 и Ca_3) (Ertel et al., 2000; Catterall, 2000).

Дигидропиридин-чувствительные Ca^{2+} -каналы L-типа (long-lasting) (семейство Ca_1) изучены лучше других потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и идентифицированы во многих клетках: нейронах

периферической и центральной нервной системы, клетках сердечной и скелетной мышц, клетках гладких мышц позвоночных, нейронах моллюсков (Hille, 1992, 2001; Abernethy, Soldatov, 2002). Так, Ca^{2+} -каналы L-типа играют определяющую роль в сократительной активности клеток скелетных мышц. Эти каналы активируются при высоких потенциалах на мембране (при потенциалах, более положительных, чем -10 мВ); характеризуются высокой проводимостью (25 пСм) и очень медленной кинетикой инактивации. Каналы блокируются органическими кальциевыми антагонистами трех различных групп: верапамилом и его производными; нифедипином и другими 1,4-дигидропиридинами, а также D-цис-дилтиаземом (Hille, 1992; Mori et al., 1996; Randall, 1998; Abernethy, Soldatov, 2002). Специфическим пептидным блокатором Ca^{2+} -каналов L-типа является кальцисептин (пептид из 60 аминокислот), выделенный из яда змеи черной мамбы *Dendroaspis polylepis polylepis* (De Weille et al., 1991). Активатором Ca^{2+} -каналов L-типа служит майтотоксин, выделяемый из динофлагеллят *Gambierdiscus toxicus* (Xi et al., 1992).

Ca^{2+} -каналы L-типа в сердечных и скелетных мышцах имеют сходную чувствительность к дигидропиридинам, но значительно различаются по взаимодействию с двухвалентными ионами. Каналы в сердечной мышце непроницаемы для Mg^{2+} , в то время как каналы в скелетных мышцах проницаемы для этих ионов. Ряд селективности для Ca^{2+} -каналов клеток сердечной мышцы имеет вид: $\text{La}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. Для Ca^{2+} -каналов скелетного мышечного волокна ряд селективности следующий: $\text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} \sim \text{Co}^{2+}$ (Hille, 1992).

Ca^{2+} -каналы T-типа (tiny) (семейство Ca_v3) характеризуются активацией при слабой деполяризации, быстрой потенциал-зависимой кинетикой инактивации, относительной нечувствительностью к дигидропиридинам и низкой проводимостью для Ba^{2+} (8 пСм в 110 мМ Ba^{2+}). Каналы этого типа найдены во многих возбудимых и невозбудимых (фибробласты, В-лимфоциты) клетках. Сходство каналов T- и L-типов заключается в том, что они проницаемы для Na^+ в среде, не содержащей двухвалентных ионов, и блокируются Ca^{2+} (мкМ) потенциал-зависимым образом. Однако в отличие от каналов L-типа Ca^{2+} -каналы T-типа имеют одинаковые проводимости для Ca^{2+} и Ba^{2+} , большую устойчивость к блокирующему действию Cd^{2+} и большую чувствительность к блокирующему действию Ni^{2+} . Ca^{2+} -каналы T-типа обеспечивают пейсмеккерную активность и вход Ca^{2+} при отрицательных мембранных потенциалах (Hille, 1992; Randall, 1998; Hille, 2001). Ca^{2+} -каналы T-типа блокируются тетраметрином, амилоридом, дифенилгидантоином и октанолом (Mori et al., 1996).

Ca^{2+} -каналы N-типа (семейство Ca_v2). Для Ca^{2+} -каналов N-типа (neither L- nor T-type) характерны активация при высоких потенциалах (более положительных, чем -20 мВ), относительно быстрая инактивация,

средние величины проводимости для Ba^{2+} (13 пСм), чувствительность к ω -конотоксину (ω -CgTx GVIA), токсину морской улитки *Conus geographus*, и устойчивость к дигидропиридинам (Hille, 1992; Randall, 1998). Недавно показано, что Ca^{2+} -каналы N-типа эффективно блокируются ω -фонетоксином-IIA, токсином из яда паука *Phoneutria nigriventer* (Cassola et al., 1998). Ca^{2+} -каналы N-типа найдены в синапсоммах мозга крыс, а также в нейронах коры мозга и спинного мозга. Ряд селективности имеет вид: $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$. Каналы очень чувствительны к блокирующему действию La^{3+} (20 мкМ) и по селективным свойствам близки к каналам L-типа. Ca^{2+} -каналы N-типа важны для высвобождения медиаторов в клетках (Hille, 1992; Randall, 1998).

Ca^{2+} -каналы P-типа (Purkinje-type) (семейство Ca_v2), впервые обнаруженные в клетках Пуркинье мозжечка, найдены в нейронах центральной и периферической нервной системы. Они активируются при потенциалах более положительных, чем -50 мВ, имеют очень медленную кинетику инактивации, не чувствительны к дигидропиридинам и ω -CgTx. Каналы избирательно блокируются токсинами из яда паука *Agelenopsis aperta*: FTX (мол. масса 200-400 Да) и ω -агатоксином IVA (ω -Aga-IVA) (Mori et al., 1996; Randall, 1998).

Ca^{2+} -каналы R- и Q-типа (семейство Ca_v2) идентифицированы недавно, активируются при высоких потенциалах на мембране. Эти каналы найдены в гранулярных клетках мозжечка (Zhang et al., 1993), нейронах гиппокампа и коры мозга. Ca^{2+} -каналы R- и Q-типа имеют проводимость 15 пСм и высокую чувствительность к блокирующему действию Ni^{2+} (<100 мкМ). Ca^{2+} -каналы Q-типа ингибируются ω -конотоксином ω -CgTx MVIIIC (>100 нМ) и ω -агатоксином IVA (<100 нМ) (Mori et al., 1996; Randall, 1998).

5.3.1.1. Структура Ca^{2+} -каналов

Дигидропиридинчувствительные Ca^{2+} -каналы были впервые выделены с помощью меченого нитрендипина из цистерн Т-системы скелетных мышц (Takahashi et al., 1987). Эти Ca^{2+} -каналы выполняют роль сенсора напряжения в процессах возбуждения-сокращения в мышцах. Белок Ca^{2+} -канала содержит пять субъединиц, т.е. еще больше, чем Na^+ -канал: α_1 , α_2 , β , γ и δ (рис. 28). Однако (как и в Na^+ -канале) большая α_1 -субъединица Ca^{2+} -канала обуславливает его многие функциональные свойства. Субъединица α_1 представляет собой белок из 1873 аминокислот, имеющий мол. массу 175-212 кДа. Субъединица α_1 является порообразующей, содержит рецепторные участки для антагонистов Ca^{2+} -каналов и образует функционально активные Ca^{2+} -каналы при экспрессии

ее в гетерологичных клетках (Catterall, 1988, 1993, 1995, 1996; McCleskey et al., 1993; Catterall, 2000).

Были клонированы кДНК, кодирующие α_1 -субъединицу Ca^{2+} -каналов, и установлена аминокислотная последовательность этой субъединицы. Следует отметить поразительное структурное сходство Na^+ - и Ca^{2+} -каналов. Основные субъединицы (α - и α_1 -субъединицы) этих белков содержат четыре повторяющихся домена (I-IV) из 300-400 аминокислот (рис. 29). В состав всех доменов входят шесть трансмембранных α -спиральных сегментов S1-S6. В сегменте S4 каждая третья аминокислота заряжена положительно. N- и C-концы α_1 -субъединицы находятся в цитоплазме. По-видимому, стенки поры образованы трансмембранными сегментами всех четырех доменов. Сегмент S4, содержащий положительно заряженные остатки аргинина или лизина, служит, по-видимому, сенсором напряжения (Catterall, 1988, 1995, 1996, 2000).

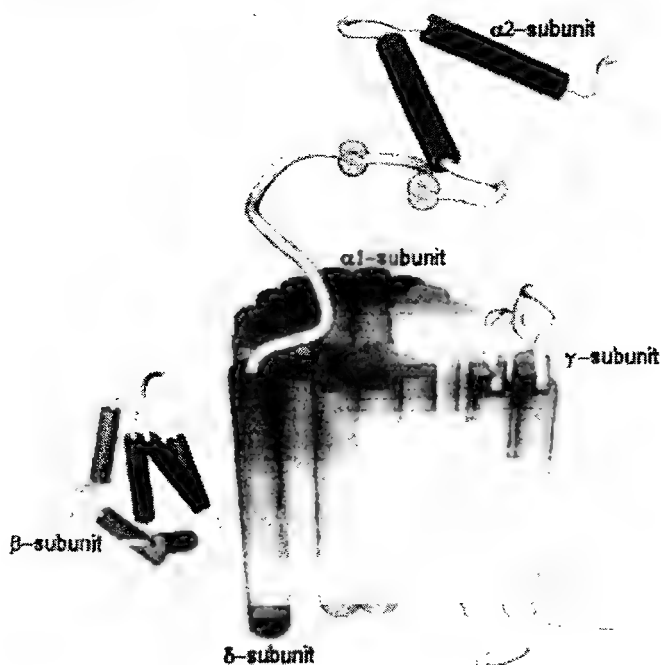


Рис. 28. Субъединичный состав потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала. α_1 , α_2 , β , γ и δ – субъединицы Ca^{2+} -канала.

В настоящее время клонировано несколько изоформ α_1 -субъединицы Ca^{2+} -каналов (Hofmann et al., 1994; Mori et al., 1996; Randall, 1998; Catterall, 2000). Так, α_{1S} -субъединица образует Ca^{2+} -канал L-типа в скелетных мышцах. Субъединица α_{1C} формирует Ca^{2+} -канал L-типа в клетках мозга, сердца, легких, фибробластах. Субъединица α_{1D} участвует в образовании Ca^{2+} -каналов L-типа в клетках мозга и клетках эндокринной системы. Субъединица α_{1A} формирует Ca^{2+} -каналы Q- и R-типа в клетках мозга и сердца. Субъединицы α_{1B} и α_{1E} образуют в нейронах мозга Ca^{2+} -каналы N- и R-типа, соответственно (Catterall, 1995; Mori et al., 1996; Randall, 1998). Недавно клонированы α_{1G} -субъединицы, формирующие Ca^{2+} -каналы T-типа в нейронах мозга крысы (Perez-Reyes et al., 1998), мышцы (Klugbauer et al., 1999) и человека (Cribbs et al., 2000).

С помощью методов молекулярного клонирования установлена первичная структура вспомогательных субъединиц Ca^{2+} -каналов (Isom et al., 1994). Субъединица α_1 Ca^{2+} -каналов L-типа из скелетных мышц выделяется вместе с цитоплазматической β -субъединицей (мол. масса 57 кДа) и трансмембранной γ -субъединицей (мол. масса 25 кДа). Субъединицы α_1 , β и γ также взаимодействуют с белковым комплексом, состоящим из связанных дисульфидной связью α_2 - (мол. масса 125 кДа) и δ - (мол. масса 27 кДа) субъединиц (Catterall, 1988, 1995, 1996, 2000) (рис. 28, 29). Субъединица α_2 представляет собой гидрофильный белок из 1106 аминокислот, имеющий несколько потенциальных трансмембранных сегментов и участков N-связанного гликозилирования. В соответствии с моделью структуры Ca^{2+} -канала, предложенной Каттералом в 1996 г. (Isom et al., 1994; Catterall, 1995, 1996), α_2 -субъединица имеет два трансмембранных сегмента. По более поздним данным (Jay et al., 1991; Hofmann et al., 1994, Catterall, 2000) α_2 -субъединица является экстраклеточной (рис. 29). Субъединица δ представляет собой белок, имеющий один трансмембранный сегмент и два участка гликозилирования. Трансмембранный сегмент δ -субъединицы имеет некоторое сходство с β_1 -субъединицей Na^+ -каналов (Isom et al., 1994). Субъединица γ является белком из 222 аминокислот, имеющим четыре трансмембранных сегмента и два участка гликозилирования. Субъединица γ входит в состав только Ca^{2+} -каналов L-типа из скелетных мышц. В отличие от трансмембранных α_2 -, δ - и γ -субъединиц, β -субъединица представляет собой гидрофильный белок из 524 аминокислот, расположенный на внутренней поверхности мембраны. Субъединица β содержит множественные участки фосфорилирования протеинкиназой A и протеинкиназой C (Isom et al., 1994; Catterall, 1995, 2000).

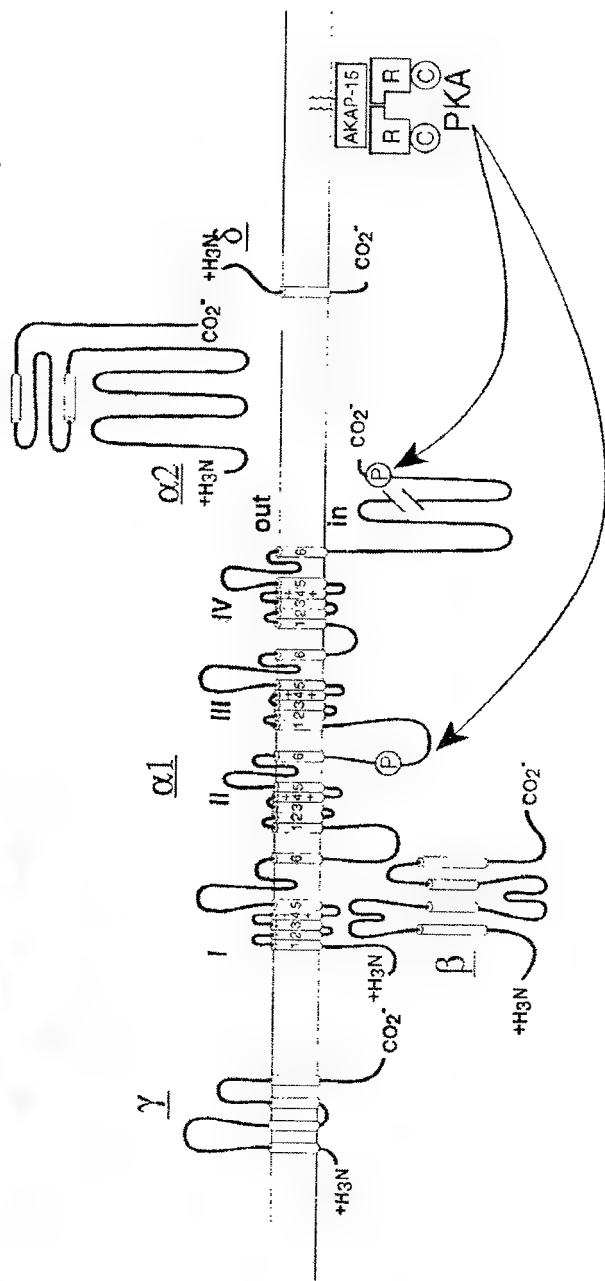


Рис. 29. Топология в мембране и регуляция Ca^{2+} -каналов L-типа ($\text{Ca}_v1.1$) из скелетных мышц. $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ и δ - субъединицы Ca^{2+} -канала. I-IV - гомологичные домены. 1-6 - трансмембранные сегменты S1-S6 $\alpha 1$ -субъединицы канала. P - участки фосфорилирования канала протеинкиназой A (PKA). R и C - регуляторная и каталитическая субъединицы протеинкиназы A, соответственно. AKAP-15 - белок, заякоривающий протеинкиназу A (A-kinase anchoring protein) (по Catterall, 2000).

Другие типы Ca^{2+} -каналов также содержат вспомогательные α_2 -, δ - и β -субъединицы. Показано, что трансмембранные субъединицы менее разнообразны, чем внутриклеточные субъединицы. Так, α_2 - и δ -субъединицы кодируются одним геном, в то время как четыре гена кодируют β -субъединицы (β_1 - β_4) Ca^{2+} -каналов (Hofmann et al., 1994; Isom et al., 1994; Catterall, 1995; Mori et al., 1996).

Обнаружено, что вспомогательные β -субъединицы модулируют функциональные характеристики всех изоформ α_1 -субъединицы Ca^{2+} -каналов: увеличивают амплитуду Ca^{2+} -токов, ускоряют кинетику активации и инактивации, сдвигают область активации каналов в сторону более отрицательных потенциалов (Hofmann et al., 1994; Isom et al., 1994; Catterall, 1995; Cens et al., 1998). Как отмечалось ранее, β -субъединицы содержат множественные участки фосфорилирования различными киназами. Более того, β -субъединицы могут дефосфорилироваться фосфатазами. Учитывая, что киназы и фосфатазы модулируют активность различных типов потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов во многих клетках (Levitan, 1994; см. кн. Крутецкая, Лебедев, 1998), можно предположить, что эффект β -субъединиц может быть частично связан с процессами фосфорилирования-дефосфорилирования (Isom et al., 1994; Catterall, 1995).

Установлено, что β -субъединицы взаимодействуют с консервативным фрагментом цитоплазматического участка, соединяющего трансмембранные домены I и II всех изоформ α_1 -субъединиц Ca^{2+} -каналов (De Waard et al., 1994; Pragnell et al., 1994) (рис. 29).

В последнее время показано, что для встраивания в мембрану класса C Ca^{2+} -каналов L-типа необходимо образование функционального комплекса между α_{1C} - и β -субъединицами (Gao et al., 1999). Кроме того, в скелетных мышцах β_{1a} -субъединица участвует в регуляции процессов возбуждения-сокращения (Beurg et al., 1999).

Использование методов молекулярной биологии позволило выявить структурные элементы, обеспечивающие основные функции Ca^{2+} -каналов: активацию, инактивацию, селективность, взаимодействие с фармакологическими агентами.

В образовании поры Ca^{2+} -канала принимают участие сегменты S5, S6 и соединяющие их внеклеточные фрагменты SS1-SS2 (P-участки) всех четырех доменов α_1 -субъединицы Ca^{2+} -канала (Catterall, 1995, 1996, 2000). Селективный фильтр Ca^{2+} -каналов, как и других потенциал-зависимых каналов (Na^+ - и K^+ -каналов), образован P-участками всех четырех гомологичных доменов порообразующей α_1 -субъединицы (Catterall, 1995; Mori et al., 1996).

Для α_1 -субъединицы дигидропиридин-чувствительных Ca^{2+} -каналов L-типа показано, что участок связывания неорганических катионов находится в поре (селективном фильтре) Ca^{2+} -канала. В связывании катионов участвуют карбоксильные группы четырех отрицательно заряженных остатков глутамата четырех сегментов SS1-SS2, образующих пору Ca^{2+} -канала (Mikala et al., 1993; Yang et al., 1993).

Использование современных молекулярно-биологических методов позволило в последнее время идентифицировать в структуре потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов определенные домены и даже отдельные аминокислоты, участвующие во взаимодействии с классическими блокаторами. Так, для α_1 -субъединицы Ca^{2+} -каналов L-типа показано, что в связывании Ca^{2+} -антагонистов дигидропиридиновой природы принимают участие сегменты S5, S6 и соединяющий их фрагмент SS1-SS2 домена III, а также фрагмент SS1-SS2 и сегмент S6 домена IV (Mori et al., 1996; Peterson et al., 1996). В сегменте S5 домена III выявлены даже конкретные аминокислоты (Thr-1066 и Gln-1070), имеющие принципиальную значимость для связывания 1,4-дигидропиридинов (Mitterdorfer et al., 1996). Ca^{2+} -антагонисты фенилалкиламиновой природы взаимодействуют с кластером из трех аминокислот (Tyr-1463, Ala-1467, Ile-1470) в центре сегмента S6 домена IV α_1 -субъединицы Ca^{2+} -канала L-типа (Hockerman et al., 1995). Производные бензотиазепина (дилтиазем) взаимодействуют с сегментами S6 доменов III и IV α_1 -субъединицы Ca^{2+} -канала L-типа. Показано, что для связывания с дилтиаземом важны Phe-1164 и Val-1165, локализованные в сегменте S6 домена III (Kraus et al., 1998). Установлено также, что для частотно-зависимого блокирования (use-dependent block) каналов производными фенилалкиламинов и бензотиазепинов важен сегмент S5 домена IV (Motoike et al., 1999). В последнее время обнаружено, что сегмент S6 домена IV имеет принципиальную значимость для связывания всех групп органических блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа (Lacinova et al., 1996). Все указанные выше сегменты S5, S6 и соединяющие их фрагменты SS1-SS2 участвуют в образовании поры Ca^{2+} -канала.

Установлены также структурные детерминанты Ca^{2+} -каналов N-типа, отвечающие за связывание ω -CgTx GVIA. Показано, что ω -CgTx GVIA взаимодействует с внеклеточным фрагментом между сегментом S5 и P-участком домена III α_{1B} -субъединицы Ca^{2+} -каналов (Ellinor et al., 1994).

Для дигидропиридин-чувствительных Ca^{2+} -каналов L-типа из скелетных мышц, играющих ключевую роль в процессах возбуждения-сокращения, показано, что внутриклеточные участки, соединяющие домены II и III и домены III и IV α_1 -субъединицы Ca^{2+} -канала, взаимодействуют со специфическим фрагментом рианодинового рецептора (RyR-1) (аминокислоты Lys-954 - Asn-1112) (Leong,

MacLennan, 1998). Известно, что RyR-1 не только "получает сигнал" от дигидропиридинового рецептора, но и "посылает" ретроградный сигнал, который увеличивает активность Ca^{2+} -канала. Обнаружено, что фрагмент RyR-1, включающий аминокислоты 1635-2636, имеет принципиальную значимость для процессов возбуждения - сокращения и увеличения активности Ca^{2+} -каналов L-типа, в то время как последовательность аминокислот (2659-3720) важна только для повышения активности Ca^{2+} -каналов (Nakai et al., 1998).

Как отмечалось ранее, инактивация Ca^{2+} -каналов более сложная, чем Na^+ -каналов. В дополнение к потенциал-зависимой инактивации (которая в 50 раз более медленная, чем у Na^+ -каналов), для Ca^{2+} -каналов обнаружена Ca^{2+} -зависимая инактивация, возникающая в результате повышения $[\text{Ca}^{2+}]$, во время деполяризующего импульса. Обнаружено, что сегмент S6 домена I и небольшие внутри- и внеклеточные участки, примыкающие к этому сегменту в α_1 -субъединице Ca^{2+} -канала, могут быть молекулярными детерминантами потенциал-зависимой инактивации (Zhang et al., 1994). Исследования последних лет показали, что для потенциал-зависимой инактивации Ca^{2+} -каналов имеет также значение внутриклеточный C-терминальный фрагмент α_1 -субъединицы. Так, в C-терминальном участке α_1 -субъединицы Ca^{2+} -каналов выявлен фрагмент из 80 аминокислот (1572-1651), определяющий как потенциал-зависимую, так и Ca^{2+} -зависимую инактивацию (Soldatov et al., 1997).

С использованием флуоресцентной микроскопии одиночных молекул показано, что Ca^{2+} -каналы L-типа из клеток сердца образуют большие агрегаты (кластеры), имеющие значительную подвижность в мембране (Harms et al., 2001).

5.3.1.2. Модуляция активности Ca^{2+} -каналов

Ca^{2+} -каналы, так же как и Na^+ - и K^+ -каналы, регулируются и модулируются различными физиологическими факторами: гормонами, нейротрансмиттерами, G-белками. В настоящее время достаточно хорошо изучена модуляция активности Ca^{2+} -каналов серин/треониновыми киназами, такими как протеинкиназа C, протеинкиназа A и Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая киназа (Levitan, 1985, 1988, 1994; Hille, 1992; Hosey et al., 1992). Сравнительно недавно появились данные, свидетельствующие о роли тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в регуляции активности различных типов Ca^{2+} -каналов (см. кн. Крутецкая, Лебедев, 1998; Davis et al., 2001).

Для семейства Ca_v1 Ca^{2+} -каналов (каналы L-типа) одним из основных механизмов регуляции является фосфорилирование их различными протеинкиназами (Catterall, 2000). Так, фосфорилирование Ca^{2+} -каналов L-типа в скелетных мышцах (каналы $\text{Ca}_v1.1$) протеинкиназой

А приводит к увеличению Ca^{2+} -токов. Участками фосфорилирования протеинкиназой А являются: Ser 687 во внутриклеточном фрагменте между доменами II и III и Ser 1854 на С-конце $\alpha 1$ -субъединицы, а также Ser 182 и Tre 205 на β -субъединице Ca^{2+} -канала (рис. 29). Ca^{2+} -каналы L-типа в сердечных мышцах (каналы $\text{Ca}_v1.2$) также эффективно модулируются протеинкиназой А и протеинкиназой С (Catterall, 2000; Kamp, Hell, 2000). Фосфорилирование Ca^{2+} -каналов этими протеинкиназами приводит к увеличению Ca^{2+} -токов. ПКА активируется при активации $\beta 1$ - и $\beta 2$ -адренорецепторов, а ПКС активируется при активации $\alpha 1$ -адренорецепторов. ПКА фосфорилирует Ser 1928 на С-конце $\alpha 1$ -субъединицы и Ser 478 и Ser 479 на β -субъединице Ca^{2+} -канала. Участками фосфорилирования каналов протеинкиназой С являются Tre 27 и Tre 31 на N-конце $\alpha 1$ -субъединицы (рис. 30). Обнаружено, что в скелетных и сердечных мышцах протеинкиназа А заякорена около Ca^{2+} -каналов с помощью заякоривающего белка AKAP 15 (Catterall, 2000; Kamp, Hell, 2000).

Для Ca^{2+} -каналов N- и P/Q-типов (Ca_v2) (но не L-типа) одним из основных механизмов регуляции является модуляция рецепторами для нейротрансмиттеров, которые активируют G-белки, чувствительные к коклюшному токсину. Наблюдается сдвиг кривой зависимости активации канала от мембранного потенциала в сторону положительных потенциалов и замедление кинетики активации. Обнаружено, что модулирующий эффект нейротрансмиттеров обусловлен $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков, которые прямо связываются с $\alpha 1$ -субъединицей Ca^{2+} -каналов (Dolphin, 1995, 1998; Herlitze et al., 1996, 1997; De Waard et al., 1997; Catterall, 2000). Значительное число экспериментальных данных свидетельствует о том, что $\beta\gamma$ -субъединицы G-белков прямо взаимодействуют с фрагментом из пяти аминокислот (Gln-X-X-Glu-Arg), расположенным во внутриклеточном участке, соединяющем домены I и II α_{1A} - или α_{1B} -субъединицы Ca^{2+} -каналов P/Q- или N-типа, соответственно (Dolphin, 1995, 1998; Herlitze et al., 1996, 1997; De Waard et al., 1997; Catterall, 2000) (рис. 31). Нейротрансмиттеры, активирующие протеинкиназу С, обращают ингибирование Ca_v2 каналов $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков. Это обусловлено фосфорилированием протеинкиназой С участков $\alpha 1$ -субъединицы, расположенных во внутриклеточном фрагменте между доменами I и II рядом с участком связывания $\beta\gamma$ -субъединиц (Zamponi et al., 1997) (рис. 31). Ранее было установлено, что фрагмент Gln-X-X-Glu-Arg участвует также во взаимодействии $\beta\gamma$ -субъединиц G-белков с такими белками мишенями, как аденилатциклаза типа II, фосфолипаза $\text{C}\beta_2$ и K^+ -каналы входящего выпрямления (Chen et al., 1995).

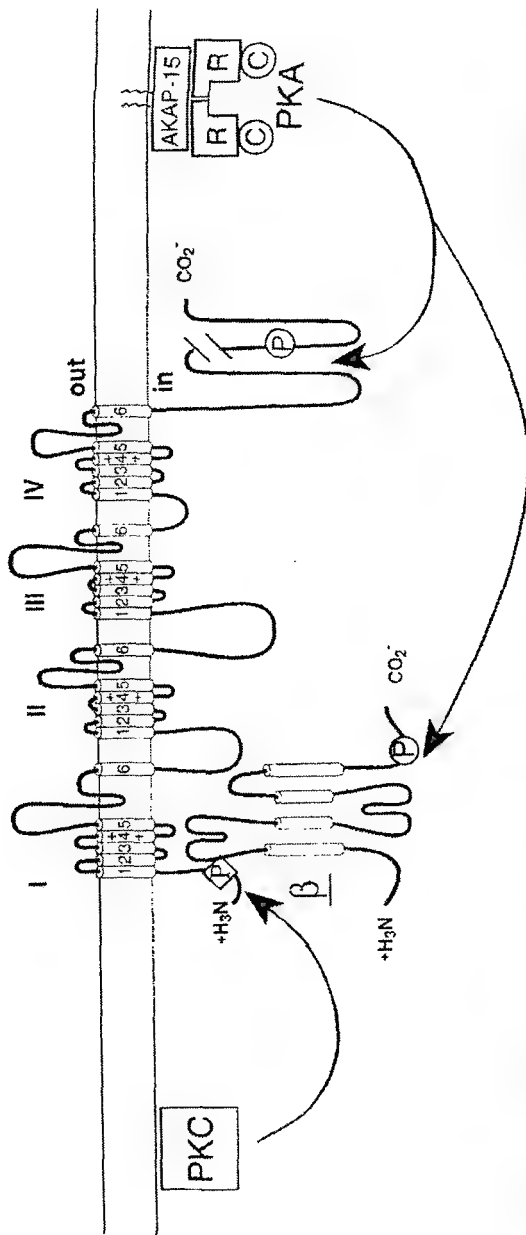


Рис. 30. Модуляция Ca^{2+} -каналов L-типа ($\text{Ca}_v1.2$) в клетках сердца протеинкиназой A и протеинкиназой C.
 $\alpha 1$, β - субъединицы Ca^{2+} -канала. P - участки фосфорилирования канала протеинкиназой A (PKA) и протеинкиназой C (PKC). R и C - регуляторная и каталитическая субъединицы протеинкиназы A, соответственно. AKAP-15 - белок, связывающий протеинкиназу A (A-kinase anchoring protein) (по Catterall, 2000).

Показано, что замена аргинина в этом фрагменте приводит к существенному замедлению кинетики инактивации Ca^{2+} -каналов.

Особую значимость для взаимодействия с $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков имеет аминокислота, находящаяся в третьем положении фрагмента Gln-X-X-Glu-Arg (Herlitze et al., 1997). Ранее отмечалось, что β -субъединица Ca^{2+} -каналов также взаимодействует с цитоплазматическим участком, соединяющим домены I и II α_1 -субъединиц Ca^{2+} -каналов (De Waard et al., 1994; Pragnell et al., 1994).

Таким образом, внутриклеточный участок, соединяющий домены I и II α_1 -субъединицы Ca^{2+} -каналов, важен для трех различных регуляторных влияний на активность Ca^{2+} -каналов: связывания β -субъединиц Ca^{2+} -каналов, модуляции G-белками и потенциал-зависимой инактивации. Это неудивительно, так как внутриклеточные участки, соединяющие гомологичные трансмембранные домены α_1 -субъединицы, а также N- и C-терминальные фрагменты являются самыми большими доменами белка канала и наиболее вариабельными у различных изоформ α_1 -субъединицы. Вполне вероятно, что эти большие домены играют ключевую роль во взаимодействии Ca^{2+} -каналов с внутриклеточными белками, служащими внутриклеточными эффекторами или модуляторами. Сложные регуляторные взаимодействия между внутриклеточным участком, соединяющим домены I и II α_1 -субъединицы, β -субъединицей Ca^{2+} -каналов и $\beta\gamma$ -субъединицами G-белков могут обеспечивать тонкую регуляцию активности Ca^{2+} -каналов. Интересно, что соответствующий внутриклеточный участок α -субъединицы Na^+ -каналов содержит множественные участки фосфорилирования протеинкиназами A и C, которые также эффективно модулируют активность каналов (Catterall, 1995, 1996).

Ca_v2 каналы модулируются также Ca^{2+} -кальмодулином и регуляторными белками (рис. 31). Связывание Ca^{2+} -кальмодулина с C-концом α_1 -субъединицы приводит к Ca^{2+} -зависимой инактивации канала. Расположенные в пресинаптической мембране $\text{Ca}_v2.1$ и $\text{Ca}_v2.2$ каналы модулируются SNARE белками (синтаксин, SNAP-25, синаптобревин) и синаптотагмином. Регуляторные белки взаимодействуют с участком, расположенным в цитоплазматическом фрагменте между доменами II и III α_1 -субъединицы канала (Catterall, 2000).

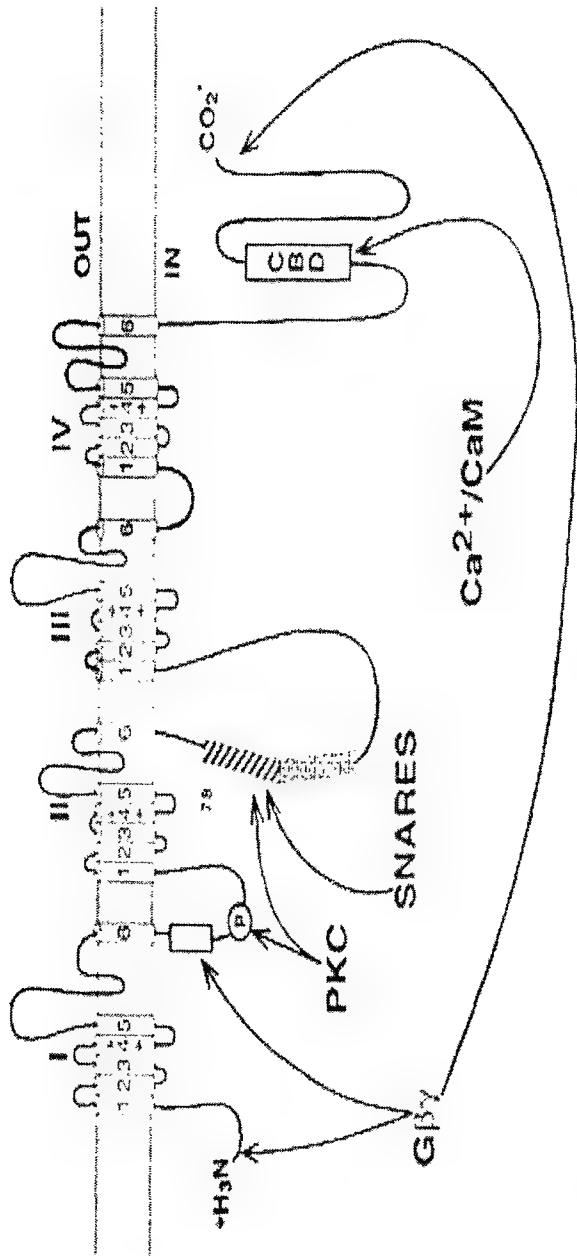


Рис. 31. Модуляция Ca_v2 каналов протеинкиназой C, $\beta\gamma$ -субединицами G-белков, Ca^{2+} -кальмодулином и регуляторными белками.

$\text{G}\beta\gamma$ - $\beta\gamma$ -субединицы G-белков. PKC - протеинкиназа C. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ - Ca^{2+} -кальмодулин. SNAREs - регуляторные белки (синтаксин, SNAP-25, синаптобревин) (по Catterall, 2000).

5.3.2. Механизмы входа Ca^{2+} в невозбудимые клетки

Основными путями входа Ca^{2+} в клетку являются Ca^{2+} -проницаемые ионные каналы. В нервных, мышечных и других электрически возбудимых клетках вход Ca^{2+} обеспечивается потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами. В невозбудимых клетках механизмы входа Ca^{2+} менее изучены. Исследования последних лет, в частности с использованием метода пэтч-клэмп, выявили наличие в плазматической мембране многих типов клеток рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов, открытие которых связано с активацией специфических рецепторов в мембране (Mahaut-Smith et al., 1990; Mozhayeva et al., 1991; Авдонин. Ткачук, 1994; Naumov et al., 1992, 1995a, 1995b, 1995c).

Выделяют три типа рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов (Meldolesi, Pozzan, 1987). 1) Собственно рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы, у которых участок связывания лиганда и ионный канал находятся на одном и том же полипептиде или на одном и том же молекулярном комплексе. К этой группе относят катионный канал никотинового ацетилхолинового рецептора, канал NMDA-рецептора. 2) Ca^{2+} -каналы, регулируемые вторичными посредниками (т. е. каналы, связанные с рецептором через растворимый вторичный посредник). 3) Ca^{2+} -каналы, управляемые G-белками, т.е. связанные с рецептором через G-белок (Meldolesi, Pozzan, 1987; см. обз. Крутецкая, Лебедев, 1992а, 1992б; Авдонин, Ткачук, 1994; см. кн. Крутецкая, Лонский, 1994; см. кн. Крутецкая, Лебедев, 2000б).

Все отмеченные типы Ca^{2+} -каналов различаются по способу активации и, вероятно, по характеру Ca^{2+} -сигналов, которые они генерируют. Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы обеспечивают быстрый, но кратковременный вход Ca^{2+} . Открывание же рецептор-управляемых Ca^{2+} -каналов приводит к быстрому и длительному увеличению концентрации цитоплазматического Ca^{2+} .

5.3.2.1. Депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетки

В настоящее время предполагают, что одним из основных механизмов входа Ca^{2+} в электрически невозбудимые клетки является так называемый депо-зависимый или "емкостной" вход Ca^{2+} , впервые постулированный Джеймсом Патни (Putney, 1986, 1990). "Емкостная" (capacitative) модель входа Ca^{2+} в клетки, объясняющая рецептор-активируемый вход Ca^{2+} в клетки, основывается на исследованиях Ca^{2+} -сигнализации в невозбудимых клетках экзокринных желез (ацинарных клетках околоушной железы крысы) и эпителиальных клетках.

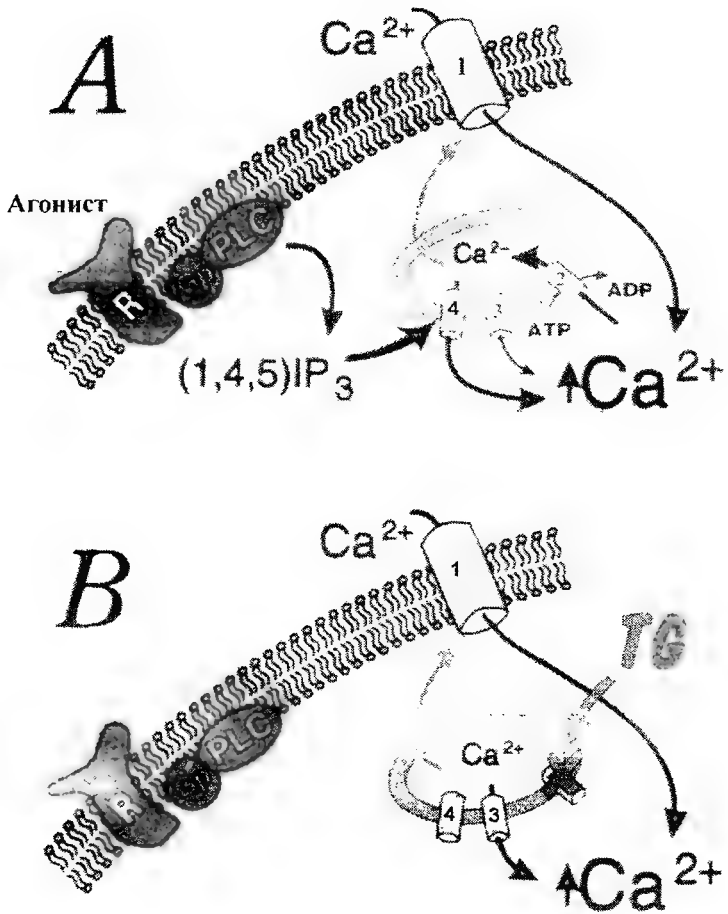
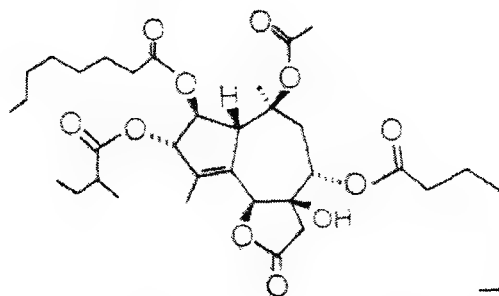


Рис. 32. "Емкостная" модель входа Ca^{2+} в клетку.

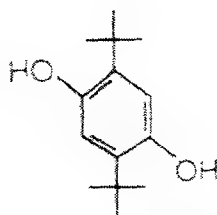
А: Связывание агониста с рецептором (R) в плазматической мембране приводит к активации гетеротримерного G-белка (G_p) и последующей стимуляции полифосфоинозитид-специфической фосфолипазы C (PLC). Образующийся инозитол-1,4,5-трифосфат ($(1,4,5)\text{IP}_3$) активирует IP_3 -чувствительные каналы Ca^{2+} -выброса (4), вызывая быструю мобилизацию Ca^{2+} из депо. Освобождение Ca^{2+} из депо активирует каким-то образом Ca^{2+} -канал (1) в плазматической мембране.

В: Тапсигаргин (TG) освобождает Ca^{2+} из депо независимо от активации рецепторов и генерации IP_3 , специфически ингибируя микросомальные Ca^{2+} -АТФазы (2). Ca^{2+} выходит из эндоплазматического ретикулума путем пассивной утечки (3). TG активирует вход Ca^{2+} в клетку в той же степени, что и агонисты, активирующие рецепторы (по Putney, 1997).

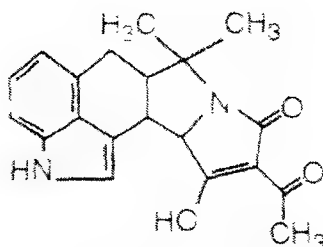
Ингибиторы Ca^{2+} -АТФаз



Тапсигаргин



2,5-ди-(трет-бутил)-
1,4-бензогидрохинон
(DBHQ)



Циклопiazониковая к-та

Рис. 33. Структура ингибиторов эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз.

В соответствии с емкостной гипотезой, вход Ca^{2+} из наружной среды регулируется степенью заполнения IP_3 -чувствительных Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} . По аналогии с конденсатором в электрической цепи, Ca^{2+} -депо препятствуют входу Ca^{2+} , когда они заполнены, "заряжены", но мгновенно начинают

активировать вход Ca^{2+} в клетку при их опустошении, "разрядке" (рис. 32, а).

Емкостной вход Ca^{2+} стимулируется различными агентами, такими как Ca^{2+} -мобилизующие агонисты или фармакологические агенты, общим свойством которых является способность вызывать освобождение Ca^{2+} из депо. Удобными инструментами для прямого исследования емкостного входа Ca^{2+} оказались специфические ингибиторы эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, обеспечивающих аккумуляцию Ca^{2+} в ЭР или СР (рис. 33).

Типичным представителем ингибиторов микросомальных Ca^{2+} -АТФаз является опухолевый промотор тапсигаргин (Jackson et al., 1988; Thastrup et al., 1990). Тапсигаргин представляет собой сесквитерпеновый лактон, выделяемый из растения *Thapsia garganica*. Обнаружено, что тапсигаргин вызывает пассивную мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо независимо от активации рецепторов и генерации инозитолфосфатов, специфически ингибируя микросомальные Ca^{2+} -АТФазы (Jackson et al., 1988; Thastrup et al., 1989, 1990). С помощью методов направленного мутагенеза показано, что тапсигаргин специфически связывается с сегментом S_3 эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз (Zhong, Inesi, 1998). В соответствии с предсказаниями "емкостной" модели было установлено, что тапсигаргин активирует вход Ca^{2+} в клетку в той же степени, что и агонисты, активирующие рецепторы (Thastrup et al., 1990, 1994) (рис. 32, б).

В дальнейшем были идентифицированы два других структурно отличных ингибитора микросомальных Ca^{2+} -АТФаз, которые также как тапсигаргин вызывают мобилизацию Ca^{2+} из депо и активируют вход Ca^{2+} из наружной среды: циклопязониковая кислота (Goeger et al., 1988; Mason et al., 1991; Demaurex et al., 1992) и 2,5-ди-(трет-бутил)-1,4-бензогидрохинон (DBHQ) (Mason et al., 1991) (рис. 33). Различие структуры тапсигаргина, циклопязониковой кислоты и DBHQ свидетельствует в пользу того, что активация входа Ca^{2+} не является побочным эффектом этих агентов, не связанным с ингибированием Ca^{2+} -АТФаз.

Использование ингибиторов эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз и других методических подходов позволило идентифицировать депо-зависимый вход Ca^{2+} в различных типах невозбудимых клеток (эндотелиальные клетки, ацинарные клетки экзокринных желез, клетки крови, ооциты, гепатоциты и др.), а также в ряде возбудимых клеток (гладкомышечные клетки, хромаффинные клетки, GH₃-клетки гипофиза) (Parekh, Penner, 1997; Putney, 1997; Holda et al., 1998). Депо-зависимый вход Ca^{2+} является, по-видимому, универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки. В то же время, механизм, посредством которого информация об опустошении Ca^{2+} -депо передается от ЭР к Ca^{2+} -каналам в плазматической мембране, остается неясным.

5.3.2.2. Модели депо-зависимого входа Ca^{2+} в клетки

Выделяют четыре группы моделей депо-зависимого входа Ca^{2+} (Putney et al., 2001): 1) модели, предполагающие существование водорастворимого вторичного посредника, который образуется и освобождается при опустошении Ca^{2+} -депо и активирует Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране (Putney, 1990, 1997; Putney, Bird, 1993; Трепакова et al., 2000); 2) модели "конформационного связывания" (conformational coupling model), предполагающие существование прямых белок-белковых взаимодействий между Ca^{2+} -депо и Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране (Irvine, 1990, 1992; Berridge, 1995a; Putney, 1999a, 1999b; Berridge et al., 2000; Ma et al., 2000); 3) модели, согласно которым активация емкостного входа Ca^{2+} является результатом встраивания в плазматическую мембрану мембранных везикул, содержащих депо-зависимые Ca^{2+} -каналы (Fasolato et al., 1993; Somasundaram et al., 1995); 4) модели связывания по типу секреции (secretion-like coupling model), предполагающие прямое физическое, но обратимое связывание внутриклеточного Ca^{2+} депо с плазматической мембраной путем подтягивания депо к мембране (Patterson et al., 1999; Yao et al., 1999; Rosado, Sage, 2000a; Rosado et al., 2000).

Модели с участием водорастворимых вторичных посредников.

После того, как модель емкостного входа Ca^{2+} получила широкое признание, основные усилия исследователей были направлены на выяснение природы сигнала, связывающего опустошение Ca^{2+} -депо с активацией Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране. Ряд авторов полагает, что при опустошении Ca^{2+} -депо освобождается водорастворимый мессенджер, который диффундирует к плазматической мембране и активирует вход Ca^{2+} (Clapham, 1993; Putney, Bird, 1993; Putney, McKay, 1999) (рис. 34).

Веские аргументы в пользу существования растворимого посредника получены при исследовании регуляции входа Ca^{2+} в ооцитах *Xenopus*. С помощью метода пэтч-кламп в конфигурации "cell-attached" было показано (Parekh et al., 1993), что опустошение Ca^{2+} -депо, вызванное стимуляцией рецепторов 5-гидрокситриптамина, приводит к активации входящего Ca^{2+} -тока. При изоляции мембранного фрагмента и образовании конфигурации "inside-out" наблюдается уменьшение тока, связанное, по-видимому, с потерей фактора, необходимого для активации Ca^{2+} -тока. Интересно, что при "возвращении" фрагмента обратно в клетку ("patch-cramming" technique) происходит восстановление тока. Представляется маловероятным, что такая процедура будет способствовать восстановлению специализированных структурных связей между каналами в плазматической мембране и внутриклеточными

органеллами. Скорее можно предположить, что некий растворимый фактор остается в цитоплазме активированных ооцитов и, когда мембранный фрагмент возвращается в цитоплазму, этот мессенджер активирует Ca^{2+} -каналы (Parekh et al., 1993). В то же время, эти данные не исключают возможность взаимодействий между ЭР и плазматической мембраной, т.к. известно, что изолированные фрагменты мембраны обычно содержат значительное количество примембранных органелл (Ruknudin et al., 1991). Интересно, что депо-зависимый вход Ca^{2+} и, по-видимому, время жизни растворимого мессенджера увеличиваются при добавлении специфического ингибитора фосфатаз 1 и 2А ооцитарной кислоты (Parekh et al., 1993). Это может свидетельствовать о том, что мессенджер инактивируется фосфатазой, чувствительной к ооцитарной кислоте, или что какая-то стадия, следующая за образованием мессенджера, связана с фосфорилированием участка, который дефосфорилируется фосфатазой.

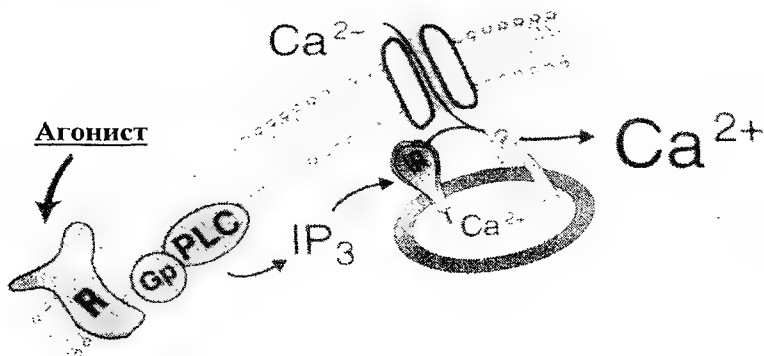


Рис. 34. Модель, предполагающая наличие растворимого мессенджера, активирующего емкостной вход Ca^{2+} .

R - рецептор; G_p - G-белок; PLC - фосфолипаза C; IR - IP₃-рецептор (по Putney, 1997).

Рандриамампита и Тьен (Randriamampita, Tsien, 1993) также представили данные о существовании нового растворимого мессенджера, который может связывать опустошение Ca^{2+} -депо с входом Ca^{2+} из наружной среды. Авторы обрабатывали Т-клетки линии Jurkat фитогемагглютинином, вызывали мобилизацию Ca^{2+} из депо и воздействовали клеточным экстрактом на три различных типа клеток: макрофагоподобные клетки линии P388D1, клетки астроцитомы и фибробласты. Было обнаружено, что клетки линии Jurkat действительно

содержат вещество, которое может активировать вход Ca^{2+} во всех трех типах клеток. Это вещество было названо фактором входа Ca^{2+} (CIF, calcium influx factor). Интересно, что CIF активировал вход Ca^{2+} только при внеклеточном приложении к интактным клеткам. Это свидетельствует о том, что CIF может проникать через мембрану или что происходят специфические транспортные процессы, способствующие проникновению CIF на цитоплазматическую поверхность мембраны, где он, по-видимому, действует. Авторы провели химическую идентификацию CIF. Установлено, что CIF представляет собой низкомолекулярное фосфорилированное соединение (мол. масса 500 Да) небелковой природы, содержащее гидроксильные группы на соседних атомах углерода и имеющее суммарный отрицательный заряд (Randriamampita, Tsien, 1993).

В последующей работе Рандриамампита и Тьен (Randriamampita, Tsien, 1995) показали, что в клетках астроцитомы ингибиторы фосфатаз ооаидиновая кислота или циклоспорин А потенцируют вход Ca^{2+} , вызванный низкими концентрациями CIF, тапсигаргина или карбахола. В Т-клетках линии Jurkat ооаидиновая кислота потенцирует вход Ca^{2+} , индуцированный низкими концентрациями фитогемагглютина, и увеличивает количество экстрагируемого CIF. Кроме того, ингибиторы фосфатаз предотвращают деградацию CIF, наблюдающуюся в гомогенатах лимфоцитов.

Данные о присутствии фактора, активирующего вход Ca^{2+} , в экстрактах Т-клеток линии Jurkat и его освобождении в цитоплазму при активации клеток были подтверждены работами группы Патни (Bird et al., 1995; Gilon et al., 1995). Наличие сходного фактора было обнаружено также в экстрактах нейтрофилов (Davies, Hallett, 1995; Shibata et al., 1996). Показано, что активаторы протеинкиназы С форболовые эфиры ингибируют Ca^{2+} -ответ клеток на приложение экстракта, но не влияют на образование фактора входа Ca^{2+} (Shibata et al., 1996). Обнаружено (Gilon et al., 1995), что экстракты из Т-клеток линии Jurkat содержат не только CIF, но и другие сигнальные факторы. В частности, в клетках слезных желез, гепатоцитах и ооцитах Хепорус экстракты вызывали двухфазные Ca^{2+} -сигналы, связанные с мобилизацией Ca^{2+} из депо и входом Ca^{2+} из наружной среды. Ca^{2+} -ответы, вызываемые экстрактом, полностью блокируются при приложении ингибитора IP_3 -рецепторов гепарина или антагониста мускариновых рецепторов атропина, что свидетельствует о том, что экстракт может активировать мускариновые рецепторы в плазматической мембране, что приводит к увеличению концентрации IP_3 . Эти данные позволяют авторам предположить, что неочищенные экстракты клеток содержат несколько активных факторов и таким образом поставить под сомнение роль CIF как сигнала для активации емкостного входа Ca^{2+} (Gilon et al., 1995).

В лаборатории Хэнли (Kim et al., 1995; Thomas, Hanley, 1995) из экстракта Т-клеток линии Jurkat был выделен CIF, активирующий вход Ca^{2+} при микроинъекции его в ооциты Xenopus. Этот новый CIF, действующий с внутренней поверхности мембраны, представляет собой полярное фосфорилированное соединение малой мол. массы (<1000 Да). Так же как и в работе Рандриамампита и Тьена (Randriamampita, Tsien, 1995), активность этого CIF потенцируется при приложении ингибитора фосфатаз оадаиковой кислоты (Thomas, Hanley, 1995).

В пользу существования растворимого мессенджера, освобождающегося при опустошении Ca^{2+} -депо и активирующего вход Ca^{2+} , свидетельствуют также данные, полученные на нейтрофилах человека с использованием новой методики конфокального лазерного сканирования (Pettit, Hallett, 1996). Обнаружено временное и пространственное разобщение мобилизации Ca^{2+} из депо и входа Ca^{2+} в нейтрофилы. Освобождение Ca^{2+} из депо, охватывающее в среднем область 0,78 мкм в диаметре, всегда предшествует входу Ca^{2+} , который регистрируется в среднем через 840 мс после начала мобилизации Ca^{2+} . Квадрат расстояния (4,28 мкм) между участком мобилизации Ca^{2+} и плазматической мембраной коррелирует с временем между мобилизацией Ca^{2+} из депо и входом Ca^{2+} в клетку, что согласуется с диффузией мессенджера от Ca^{2+} -депо к Ca^{2+} -каналам в плазматической мембране. Этот мессенджер, диффундирующий на среднее расстояние 4,28 мкм к плазматической мембране, имеет коэффициент диффузии 20 мкм²/с и мол. массу 15 кДа (Pettit, Hallett, 1996).

Таким образом, данные о природе CIF весьма противоречивы и для подтверждения этой модели необходима более четкая и полная идентификация CIF.

На роль вторичных посредников, активирующих депо-зависимый вход Ca^{2+} , выдвигаются также следующие агенты. Так, было высказано предположение, что ЦГМФ может являться сигналом для активации или модулятором депо-зависимого входа Ca^{2+} в ацинарные клетки поджелудочной железы (Pandolf, Schoeffield-Payne, 1990; Bahnson et al., 1993; Xu et al., 1994). На некоторых типах клеток обнаружено участие гетеротримерных G-белков (Jaconi et al., 1993; Fernando, Barritt, 1994; Petersen, Berridge, 1995; Xu et al., 1995) или G-белков малой мол. массы (Bird, Putney, 1993; Fasolato et al., 1993; Somasundaram et al., 1995; Rosado, Sage, 2000b) в регуляции емкостного входа Ca^{2+} . В соответствии с одной из моделей депо-зависимого входа Ca^{2+} цитохром P-450, расположенный в мембране Ca^{2+} -депо, или один из продуктов его метаболизма может передавать сигнал от опустошенных Ca^{2+} -депо к плазматической мембране, иницируя тем самым вход Ca^{2+} (Alvarez et al., 1991, 1992; Montero et al., 1991). В пользу этой модели свидетельствуют данные о том, что "емкостной" вход Ca^{2+} в разных объектах эффективно

блокируется ингибиторами цитохром Р-450-подобных ферментов - имидазольными антимикотическими агентами (эконазолом, миконазолом, клотримазолом, проадифеном) (Крутецкая и др., 1998; Sargeant et al., 1992; Mason et al., 1993; Wenzel-Seifert et al., 1996; Xiao et al., 1998). Предполагают также, что компонентом CIF, активирующим депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетки, может быть арахидоновая кислота (Rzagalinski et al., 1996; Van der Zee et al., 1995) или продукт эпосигеназного пути окисления арахидоновой кислоты - 5,6-эпоксидэйкозатриеновая кислота (Graier et al., 1995; Rzagalinski et al., 1999).

Существует также предположение, что ключевую роль в передаче информации от Ca^{2+} -депо к плазматической мембране играет фосфорилирование белков по тирозину (Vostal et al., 1991; Vostal, Shulman, 1992; Sargeant et al., 1993a, 1993b; Sage et al., 1994). Востал и др. (Vostal et al., 1991) предположили, что цитоплазматический Ca^{2+} и Ca^{2+} в депо антагонистически регулируют фосфорилирование специфических белков тромбоцитов по тирозину и вход Ca^{2+} в клетку. В этой модели повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме активирует тирозинкиназу, что приводит к фосфорилированию специфических белков (мол. масса 130 кДа) в тромбоцитах и способствует входу Ca^{2+} , по-видимому, путем прямого влияния на Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране. Повышение концентрации Ca^{2+} в депо вызывает активацию тирозинфосфатазы, локализованной в мембране ЭР, так что восполнение Ca^{2+} -депо уменьшает фосфорилирование по тирозину и, следовательно, вход Ca^{2+} .

Установлено, что белок с мол. массой 130 кДа представляет собой винкулин, связанный с микрофиламентами. Предполагают, что фосфорилирование винкулина по тирозину может участвовать в регуляции проницаемости плазматической мембраны для Ca^{2+} , по-видимому, путем взаимодействия со структурами цитоскелета (Vostal, Shulman, 1992). В пользу этой гипотезы (Vostal et al., 1991) свидетельствуют данные о том, что ингибиторы тирозинкиназ подавляют вызываемый агонистами и тапсигаргином вход Ca^{2+} в тромбоциты (Sargeant et al., 1993a, 1993b) и фибробласты (Lee et al., 1993) человека, ацинарные клетки поджелудочной железы мыши (Yule et al., 1994; Pfeiffer et al., 1995), лимфоциты (Tepeš et al., 1994) и эндотелиальные клетки пупочной вены (Kruse et al., 1994; Fleming et al., 1995, 1996) человека, эпителиальные клетки толстой кишки (Bischof et al., 1995), эндотелиальные клетки коронарной артерии свиньи (Sharma, Davis, 1996), перитонсальные макрофаги крысы (Крутецкая и др., 1997a). Роль фосфорилирования тирозина в регуляции депо-зависимого входа Ca^{2+} в различные типы клеток подробно описана ранее (Крутецкая, Лебедев, 1998).

Модель. "конформационного связывания" ("conformational coupling" model). Идея о возможности прямого взаимодействия между

ЭР и плазматической мембраной была впервые высказана Робинсом Ирвином (Irvine, 1990) на основании обнаруженной гомологии между IP_3 -рецептором и риадиноновым рецептором в скелетных мышцах. По модели Ирвина, концентрация Ca^{2+} в полости депо играет ведущую роль в регуляции высвобождения Ca^{2+} из депо. Считается, что IP_3 -рецептор, трансмембранный белок мембраны ЭР, имеет два аллостерических участка связывания: один участок, обращенный к цитоплазме, связывает IP_3 ; другой участок, обращенный в полость депо, связывает Ca^{2+} . Предполагается также, что связывание Ca^{2+} со своим участком увеличивает сродство рецептора к IP_3 , а связывание IP_3 с рецептором увеличивает сродство кальциевого локуса к Ca^{2+} . При связывании Ca^{2+} со своим локусом происходит открытие канала Ca^{2+} -выброса и выход Ca^{2+} в цитоплазму. По аналогии с риадиноновым рецептором, который связывает мембрану СР с мембраной Т-трубочек в скелетных мышцах, Ирвин предположил, что IP_3 -рецептор может образовывать "мостик" между внутриклеточным кальциевым депо и плазматической мембраной. IP_3 -рецептор взаимодействует с белком в плазматической мембране (возможно с IP_4 -рецептором). Считается, что сродство IP_3 -рецептора к участку связывания его с плазматической мембраной модулируется кальцием внутри полости депо и IP_3 в цитозоле. Низкая концентрация Ca^{2+} в депо и высокая концентрация IP_3 способствуют диссоциации IP_3 -рецептора и белка в плазматической мембране (IP_4 -рецептора). Диссоциация этих двух белков приводит к освобождению Ca^{2+} из депо через канал IP_3 -рецептора, а также входу Ca^{2+} из наружной среды. Связывание IP_4 со своим рецептором в плазматической мембране также, по-видимому, способствует отщеплению IP_3 -рецептора от мембраны. Таким образом, совместное действие IP_3 и IP_4 и истощение кальциевого депо вызывают изменение конформации IP_3 -рецептора, диссоциацию его от плазматической мембраны и вход Ca^{2+} в клетку (Irvine, 1990).

Берридж (Berridge, 1995a) развил модель Ирвина и предположил, что связь между опустошением внутриклеточных Ca^{2+} -депо и активацией Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране осуществляется путем прямого взаимодействия между IP_3 -рецептором в мембране ЭР и Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране (рис. 35). Для описания этого типа взаимодействий Берридж ввел понятие "конформационное связывание" (conformational coupling). В соответствии с моделью Берриджа, большая цитоплазматическая "головка" IP_3 -рецептора, локализованная в непосредственной близости к плазматической мембране, интегрирует сигналы, регулирующие емкостной вход Ca^{2+} , и передает информацию непосредственно на депо-зависимый Ca^{2+} -канал. IP_3 -рецепторы могут иметь две различные функции: освобождать Ca^{2+} в цитозоль или передавать информацию Ca^{2+} -каналам в плазматической мембране. Учитывая, что существуют различные изоформы IP_3 -рецептора, вполне

возможно, что эти две сигнальные функции могут осуществляться различными рецепторами. Берридж предположил, что IP_3 -рецептор типа 1 опосредует мобилизацию Ca^{2+} из депо, в то время как IP_3 -рецептор типа 3 специфически связывается с депо-зависимым Ca^{2+} -каналом (Berridge, 1995a).

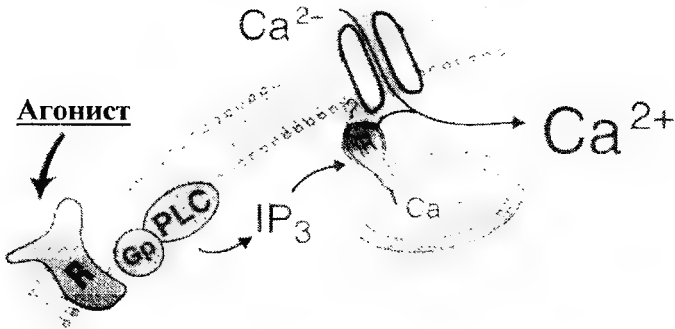


Рис. 35. Модель конформационного связывания (conformational coupling model). Связь между опустошением Ca^{2+} -депо и активацией Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране осуществляется путем физического взаимодействия между IP_3 -рецептором (IR) и Ca^{2+} -каналом. Это может быть прямое белок-белковое взаимодействие или может включать взаимодействия с цитоскелетом. R - рецептор; Gp - G-белок; PLC -фосфолипаза C (по Berridge, 1995a).

В пользу модели конформационного связывания свидетельствуют данные о пространственной локализации входа Ca^{2+} в непосредственной близости к участкам мобилизации Ca^{2+} из депо. Так, показано, что в ооцитах *Xenopus* емкостной вход Ca^{2+} колокализован с опустошенными Ca^{2+} -депо, что исключает участие растворимого посредника в активации депо-зависимого входа Ca^{2+} (Petersen, Berridge, 1996). Обнаружено также, что емкостной вход Ca^{2+} происходит только в участках мембраны ооцитов, к которым близко подходит ЭР (Jaconi et al., 1997). Колокализация депо-зависимого входа Ca^{2+} и участков IP_3 -индуцированного выброса Ca^{2+} показана с помощью конфокальной микроскопии и для эндотелиальных клеток (Huser et al., 1999).

Представляет интерес новый вариант модели сопряжения, в соответствии с которой IP_3 -рецептор, расположенный в мембране ЭР,

прямо связан с фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатом (PIP_2), локализованным в плазматической мембране (Lupu et al., 1998). В нестимулированных клетках часть IP_3 -рецепторов ингибирована вследствие взаимодействия с PIP_2 (рис. 36). Стимуляция клеток агонистами вызывает активацию фосфолипазы C, расщепляющей эту связь, что приводит к одновременному удалению ингибитора (PIP_2) и продукции активатора (IP_3) IP_3 -рецептора. Образовавшийся IP_3 активирует IP_3 -рецептор и индуцирует мобилизацию Ca^{2+} из депо (Lupu et al., 1998).

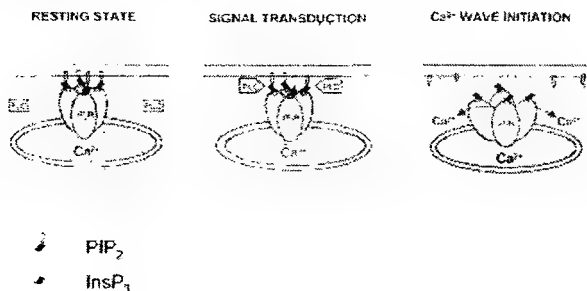


Рис. 36. Модель функционального связывания между IP_3 -рецептором (IP_3R) и фосфатидилинозитол-4, 5-дифосфатом (PIP_2).

В нестимулированных клетках часть IP_3 -рецепторов ингибирована вследствие взаимодействия с PIP_2 (resting state). Стимуляция клеток агонистами вызывает активацию фосфолипазы C (PLC), расщепляющей эту связь, что приводит к одновременному удалению ингибитора (PIP_2) и продукции активатора (IP_3) IP_3 -рецептора (signal transduction). Образовавшийся IP_3 активирует IP_3 -рецептор и индуцирует мобилизацию Ca^{2+} из депо (Ca^{2+} wave initiation) (по Lupu et al., 1998).

Основоположник емкостной модели Джеймс Патни (Putney, 1999b) предположил, что в состав сигнального комплекса IP_3 -рецептор-депо-зависимый Ca^{2+} -канал входит также фосфолипаза C и, возможно, какой-то вспомогательный белок, подобный белку InaD, функционирующему в фоторецепторах *Drosophila* (рис. 37).

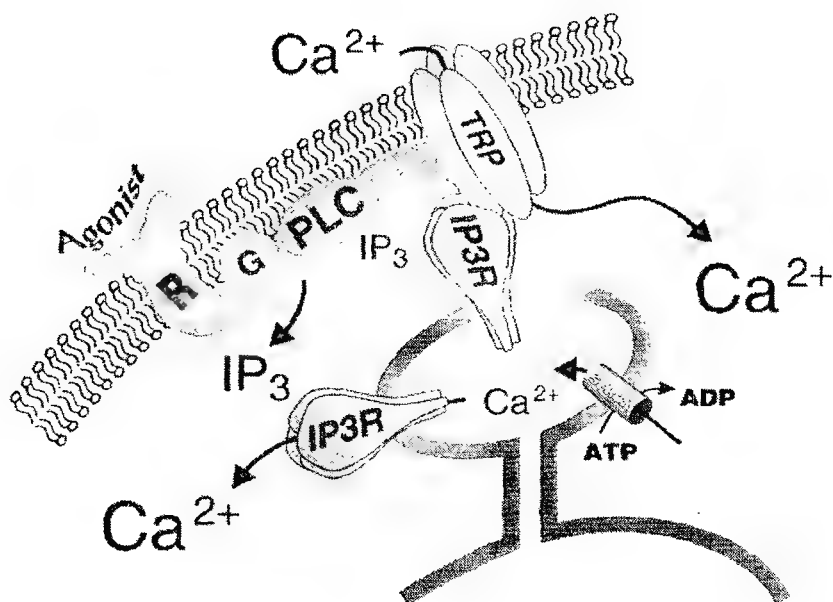


Рис 37. Модель регуляции емкостного входа Ca^{2+} IP_3 -рецепторами.

Связывание агониста с рецептором приводит к активации рецептора (R), который с участием гетеротримерного G-белка (G) активирует фосфолипазу C, катализирующую гидролиз фосфатидил-инозитол-4,5-дифосфата и образование IP_3 . IP_3 связывается с IP_3 -рецептором в мембране Ca^{2+} -депо и вызывает мобилизацию Ca^{2+} . Уменьшение концентрации Ca^{2+} в депо приводит к изменению конформации IP_3 -рецептора, взаимодействию его с депо-зависимым Ca^{2+} -каналом (TRP) и активации канала. Сигнальный комплекс, включающий PLC, TRP и IP_3 -рецептор, может также содержать вспомогательный белок InaD (по Putney, 1999 b).

Чтобы конформационная модель работала, а IP_3 -рецептор и Ca^{2+} -канал непосредственно взаимодействовали друг с другом, необходимо, чтобы ЭР достаточно близко подходил к плазматической мембране (рис. 38). Такая близость подтверждается результатами многочисленных морфологических и иммуно-гистохимических исследований, выполненных на различных типах клеток. Так, на клетках печени крысы показано, что IP_3 -рецепторы часто присутствуют во фракциях

плазматических мембран (Rossier et al., 1991; Lievremon et al., 1994). При дальнейшем фракционировании было установлено, что эти IP_3 -рецепторы локализованы в специализированных субкомпартаментах ЭР, которые тесно прилегают к плазматической мембране. Использование цитохалазина В позволило предположить, что актиновые микрофиламенты могут связывать IP_3 -рецепторы в ЭР с плазматической мембраной (Rossier et al., 1991; Lievremon et al., 1994).

Цитоскелет представляет собой сложную динамическую сеть микротрубочек и микрофиламентов, расположенную в цитоплазме клеток (Wang, 1991). В комплексе со связанными белками цитоскелет играет важную роль во многих клеточных процессах: управляет движением органелл, участвует в сборке и поддержании структуры ЭР и взаимодействии внутриклеточных Ca^{2+} -депо (Hajnóczky et al., 1994), регулирует экспрессию и функционирование ионных каналов мембран (Janmey, 1998).

На основании ультраструктурных и функциональных исследований можно предположить, что цитоскелет представляет собой трехмерную сеть, удерживающую ЭР около плазматической мембраны. Способность цитоскелета, и в первую очередь актиновых микрофиламентов, выполнять эти функции определяется частично вспомогательными белками, которые обеспечивают взаимодействие филаментов с мембранами и интегральными мембранными белками. Так, ультраструктурные иммуногистохимические данные свидетельствуют о том, что в макрофагах и тромбоцитах актин-связывающий белок гельзолин взаимодействует с плазматической мембраной и мембранами внутриклеточных органелл (ЭР, митохондрий) (Hartwig et al., 1989). Участки связывания анкирина, соединяющего интегральные мембранные белки с цитоскелетом, обнаружены на IP_3 -рецепторе из клеток Т-лимфомы мыши (Bourguignon et al., 1993a; Bourguignon, Jin, 1995), тромбоцитов человека (Bourguignon et al., 1993b) и клеток мозга крысы (Joseph, Samanta, 1993). Показано, что связывание анкирина с IP_3 -рецептором приводит к ингибированию мобилизации Ca^{2+} из депо (Bourguignon et al., 1993a; Bourguignon, Jin, 1995). Это согласуется с предположением о том, что Ca^{2+} -мобилизующая активность IP_3 -рецептора может быть блокирована, когда он находится в сопряжении с плазматической мембраной (Berridge, 1995a). Интересно, что анкирин специфически связывается также с риаодиновым рецептором из клеток Т-лимфомы мыши и модулирует активность риаодин-чувствительных Ca^{2+} -каналов (Bourguignon et al., 1995). Более того, белок *Drosophila trp* (transient receptor potential), являющийся предполагаемым гомологом депо-зависимых каналов у млекопитающих (см. ниже), также содержит три анкирин-подобных участка (Phillips et al., 1992; Hardie, Minke, 1993).

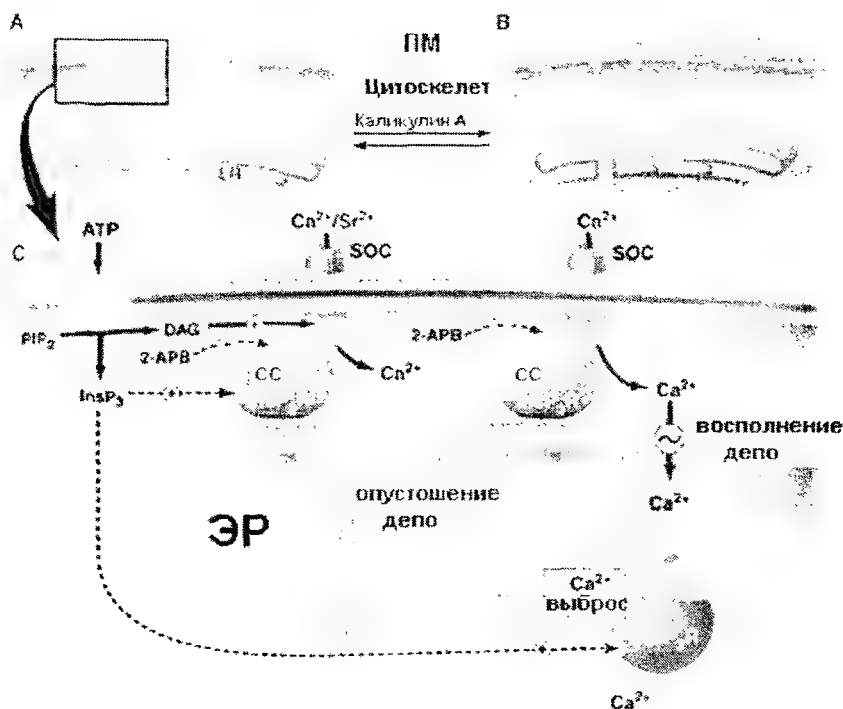


Рис. 38. Модель конформационного связывания (conformational-coupling) для депо-зависимого входа Ca^{2+} в клетки.

А - IP_3 -рецепторы, локализованные в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР), взаимодействуют с депо-зависимыми Ca^{2+} -каналами (store-operated channels, SOC) в плазматической мембране (ПМ). В - После добавления ингибитора фосфатаз каликулина А под плазмалеммой образуется плотный слой кортикального актина, нарушающий связь между IP_3 -рецепторами (IP_3R) и депо-зависимыми Ca^{2+} -каналами. С - Опустошение Ca^{2+} -депо вызывает конформационное изменение (conformational change, CC) IP_3 -рецепторов, связанных с депо-зависимыми Ca^{2+} -каналами (SOCs). Активация SOC приводит к входу Ca^{2+} в клетку (по Berridge et al., 2000).

Гомологи trp-белков, идентифицированные в тканях млекопитающих, также имеют на консервативном цитоплазматическом N-конце молекулы три-четыре анкирин-подобных домена (Wes et al.,

1995; Zhu et al., 1996; Putney, 1997; Zhu, Birnbaumer, 1998; Putney, McKay, 1999). Эти домены могут участвовать в связывании trp -белков со структурами цитоскелета. Возможно также, что анкирин-подобные фрагменты могут прямо взаимодействовать с IP_3 -рецептором. Кроме того, в последнее время показано, что все три типа IP_3 -рецепторов взаимодействуют с белками цитоскелета таллином, винкулином и α -актином (Sugiyama et al., 2000). Вышеизложенное свидетельствует о возможной роли структур цитоскелета в сопряжении IP_3 -рецептора с депо-зависимым Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране.

В пользу модели "конформационного связывания" и участия структур цитоскелета в регуляции депо-зависимого входа Ca^{2+} свидетельствуют данные, полученные на ряде невозбудимых клеток. Так, на эндотелиальных клетках линии СРАЕ сосудов показано, что прединкубация эндотелиальных клеток с цитохалазином D, разрушающим актиновые микрофиламенты, приводит к ингибированию депо-зависимого входа Ca^{2+} , вызванного тапсигаргином, и не оказывает влияния на индуцируемую АТФ мобилизацию Ca^{2+} из депо (Holda, Blatter, 1997; Holda et al., 1998).

В тромбоцитах человека (Rosado et al., 2000) и эндотелиальных клетках (Norwood et al., 2000) разрушение F-актина (действие цитохалазина D или латрункулина A) или стабилизация F-актина (приложение джасплакинолида или каликулина A) приводит к подавлению депо-зависимого входа Ca^{2+} . Агенты, разрушающие актиновые филаменты (цитохалазин D) и микротрубочки (нокодазол), ингибируют также емкостной вход Ca^{2+} в астроцитах типа I (Grimaldi et al., 1999). В эндотелиальных клетках легочной артерии крысы разрушение связи между белками цитоскелета спектрином и белком 4.1 приводит к подавлению индуцируемых тапсигаргином Ca^{2+} -сигналов и полному ингибированию токов через sgac -каналы (Wu et al., 2001).

На перитонеальных макрофагах крысы нами показано, что агенты, нарушающие структуру микротрубочек (винбластин, колхицин, колцемид) и актиновых микрофиламентов (цитохалазины, фаллоидин), существенно уменьшают фазу мобилизации Ca^{2+} из депо и практически полностью подавляют депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцированные ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопизониковой кислотой (Крутецкая и др., 2001 а). Данные результаты могут свидетельствовать как в пользу модели «конформационного связывания», так и в пользу модели встраивания везикул в плазматическую мембрану.

Модели, предполагающие встраивание в плазматическую мембрану везикул, содержащих депо-зависимые Ca^{2+} -каналы. Модели, описанные выше, основываются на представлении о том, что депо-зависимые Ca^{2+} -каналы стационарно локализованы в

плазматической мембране. Однако некоторые авторы (Fasolato et al., 1993; Somasundaram et al., 1995) предполагают, что активация емкостного входа Ca^{2+} может являться результатом встраивания в плазматическую мембрану везикул, содержащих депо-зависимые Ca^{2+} -каналы. Эта идея была выдвинута в качестве возможного объяснения участия малых ГТФ-связывающих белков в активации депо-зависимого входа Ca^{2+} , так как известно, что такие белки (типа *gab*) играют ключевую роль в регуляции опосредуемого мембранными везикулами транспорта белков (Balch, 1990). Кроме того, на мегакариоцитах крысы показано, что антималярийный агент примакхин, ингибирующий везикулярный транспорт, блокирует емкостной вход Ca^{2+} (Somasundaram et al., 1995). Авторы предполагают, что когда Ca^{2+} -депо заполнены, депо-зависимые Ca^{2+} -каналы находятся в эндомембранном компартменте под плазматической мембраной. При опустошении депо, депо-зависимые Ca^{2+} -каналы транспортируются в составе везикул от этого компартмента к плазматической мембране. При слиянии везикул с плазматической мембраной и встраивании в нее Ca^{2+} -каналов наблюдается активация емкостного входа Ca^{2+} .

Примакхин блокирует активацию входа Ca^{2+} , предотвращая, по-видимому, образование везикул, содержащих депо-зависимые Ca^{2+} -каналы (Somasundaram et al., 1995). В соответствии с этой моделью, в последнее время показано, что ингибирование везикулярного транспорта при воздействии бафиломицина приводит к уменьшению емкостного входа Ca^{2+} в эмбриональные клетки сирийского хомячка и последующему апоптозу (Jayadev et al., 1999). Обнаружено также, что для активации депо-зависимого входа Ca^{2+} в ооциты *Xenopus* необходим белок SNAP 25, участвующий в везикулярном транспорте (Yao et al., 1999).

Модели депо-зависимого входа Ca^{2+} , описанные выше, не следует, вероятно, рассматривать как взаимоисключающие. Истинный механизм депо-зависимого входа Ca^{2+} может, по-видимому, включать элементы всех разновидностей моделей, как это предполагается в модели связывания по типу секреции.

Модель связывания по типу секреции (secretion-like coupling model). Данная модель предполагает прямое физическое, но обратимое связывание внутриклеточного Ca^{2+} депо с плазматической мембраной путем подтягивания депо к мембране (Patterson et al., 1999; Yao et al., 1999; Rosado, Sage, 2000a; Rosado et al., 2000). Транслокация ЭР к плазмалемме регулируется примембранным цитоскелетом. Данная модель основывается на данных о том, что стабилизация кортикального актина при действии джасплакинолида или ингибитора фосфатаз каликулина А препятствует связыванию ЭР с Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране и приводит к ингибированию депо-зависимого входа Ca^{2+} (Patterson et al., 1999; Rosado et al., 2000; Rosado, Sage 2000a). Разборка кортикального

актина при воздействии цитохалазина Д восстанавливает связь между ЭР и плазмалеммой и активирует вход Ca^{2+} (Patterson et al., 1999).

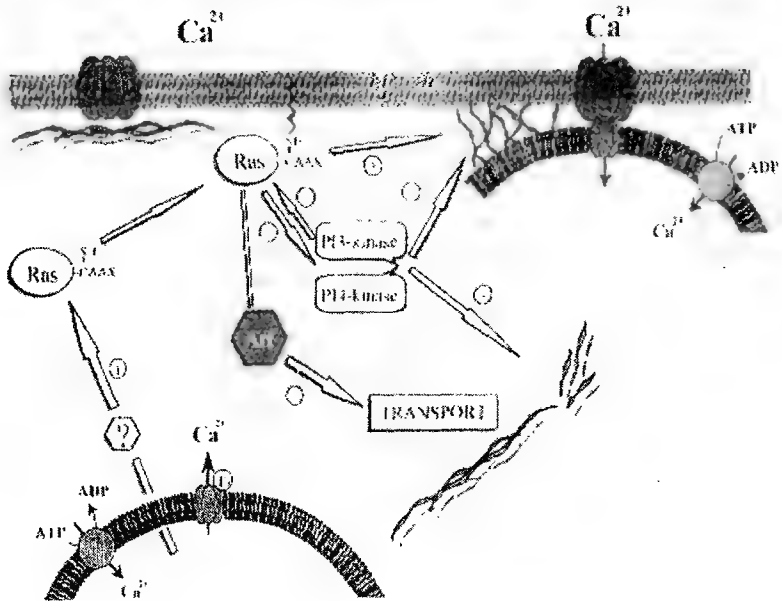


Рис. 39. Модель связывания по типу секреции (secretion-like coupling model) для емкостного входа Ca^{2+} в тромбоциты человека.

Опустошение Ca^{2+} -депо вызывает транслокацию и связывание с плазмалеммой малых G-белков семейства Ras. Активированные Ras белки вызывают полимеризацию актиновых филаментов, способствующую транспорту ЭР к плазматической мембране. В процессах внутриклеточного транспорта участвуют также Arp белки, относящиеся к семейству Ras белков. Кроме того, Ras белки могут активировать фосфоинозитид-специфические киназы (PI3-kinase and PI4-kinase), которые также могут индуцировать реорганизацию актиновых филаментов. Реорганизация примембранного цитоскелета способствует связыванию между IP_3 -рецептором в мембране ЭР и депо-зависимым Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране (по Rosado, Sage, 2000a).

Данная модель была подтверждена на тромбоцитах человека (Rosado et al., 2000; Rosado, Sage, 2000a). В соответствии с моделью связывания по типу секреции, предложенной для тромбоцитов,

опустошение Ca^{2+} -депо вызывает транслокацию и связывание с плазмалеммой малых G-белков семейства Ras (рис. 39). Активированные Ras белки вызывают полимеризацию актиновых филаментов, способствующую транспорту ЭР к плазматической мембране. Кроме того, Ras белки могут активировать фосфоинозитид-специфические киназы, которые также могут индуцировать реорганизацию актиновых филаментов. Реорганизация примембранного цитоскелета способствует связыванию между IP_3 -рецептором в мембране ЭР и депо-зависимым Ca^{2+} -каналом в плазматической мембране (Rosado et al., 2000; Rosado, Sage, 2000a) (рис. 39).

С помощью методов иммунопреципитации показано, что прямое физическое взаимодействие между trp1 -белком (функционирующим как депо-зависимый Ca^{2+} -канал) и IP_3 -рецептором наблюдается только в тромбоцитах с опустошенными Ca^{2+} -депо, а не в контрольных клетках (Rosado, Sage, 2000c). Эти данные согласуются с моделью связывания по типу секреции, в соответствии с которой реорганизация актиновых филаментов приводит к транслокации ЭР к плазмалемме и способствует взаимодействию IP_3 -рецепторов и депо-зависимых Ca^{2+} -каналов.

5.3.2.3. Биофизические характеристики и механизмы регуляции депо-зависимых Ca^{2+} -каналов

Биофизические характеристики депо-зависимых Ca^{2+} -каналов исследованы с помощью метода пэтч-кламп в конфигурации "whole cell" в целом ряде невозбудимых клеток. Ток, текущий через депо-зависимые Ca^{2+} -каналы, обозначают $I_{\text{сrac}}$ (calcium-release-activated calcium current) (Hoth, Penner, 1992, 1993). Лучше всего охарактеризованы сrac -каналы в тучных клетках (Hoth, Penner, 1992, 1993), лейкоцитарных базофилах линии RBL-2H3 (Parekh, Penner, 1996, 1997) и Т-клетках линии Jurkat (Zweifach, Lewis, 1993; Lewis, Cahalan, 1995). $I_{\text{сrac}}$ имеет свойства входящего выпрямления, активируется при гиперполяризации мембраны и имеет потенциал реверсии более положительный, чем +50 мВ. Эффект входящего выпрямления, по-видимому, обусловлен блокированием каналов внутриклеточными ионами Mg^{2+} (Kerschbaum, Cahalan, 1998).

Так же, как потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, сrac -каналы характеризуются высокой селективностью для Ca^{2+} . Однако в отличие от потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, сrac -каналы имеют очень низкую проводимость (<1 пСм). Проводимость одиночного канала для потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа (8 пСм) (Hess et al., 1986) примерно в 300 раз больше, чем таковая для сrac -каналов (24 фСм) (Zweifach, Lewis, 1993). Так же, как и потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, сrac -каналы блокируются двух- и трехвалентными катионами со следующей

эффективностью: $Ba^{2+} \approx Sr^{2+} < Ni^{2+} < Mn^{2+} \approx Co^{2+} \approx Be^{2+} < Cd^{2+} < Zn^{2+} < La^{3+}$ (Hoth, Penner, 1992, 1993).

Важным свойством $сгас$ -каналов является Ca^{2+} -зависимая инактивация. Известно несколько механизмов ингибирования $I_{сгас}$ внутриклеточными ионами Ca^{2+} . Быстрая инактивация $I_{сгас}$ является результатом связывания Ca^{2+} с участками, расположенными на расстоянии в несколько нанометров от внутриклеточного устья канала (Zweifach, Lewis, 1995a; Louzao et al., 1996; Fierro, Parekh, 1999), в то время как медленная инактивация связана с восполнением Ca^{2+} -депо (Zweifach, Lewis, 1995b). Медленная инактивация $I_{сгас}$ предотвращается внутриклеточной ЭГТА, что свидетельствует о том, что Ca^{2+} -связывающие участки, важные для процесса медленной инактивации, расположены на расстоянии от каналов, превышающем 100 нм (Zweifach, Lewis, 1995a, 1995b). Предполагают, что митохондрии могут захватывать Ca^{2+} в тех участках клетки, которые важны для процесса медленной инактивации. На лейкоэмических базофилах линии RBL обнаружен дополнительный механизм медленной Ca^{2+} -зависимой инактивации $I_{сгас}$, который запускается ионами Ca^{2+} , входящими по $сгас$ -каналам (Parekh, 1998).

Как отмечалось ранее, мощным активатором IP_3 -рецепторов является аденофостин А. На лейкоэмических базофилах крысы показано, что аденофостин А вызывает мобилизацию Ca^{2+} из депо и активирует $I_{сгас}$ при высокой внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , когда другие агенты (IP_3 , тапсигаргин, иономицин) не могли активировать $I_{сгас}$ (Huang et al., 1998; Broad et al., 1999). Предполагают, что аденофостин А может предотвращать или уменьшать быструю Ca^{2+} -зависимую инактивацию $сгас$ -каналов.

Известно, что в бескальциевой среде потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы в различных типах клеток приобретают способность пропускать одновалентные катионы (Костюк, 1986; Hess et al., 1986). На тучных клетках (Hoth, Penner, 1993) и Т-клетках линии Jurkat (Lepple-Wienhues, Cahalan, 1996; Kerschbaum, Cahalan, 1998) также показано, что при уменьшении внеклеточной концентрации двухвалентных катионов $сгас$ -каналы становятся проницаемыми для моновалентных катионов. Исследование селективности $сгас$ -каналов для различных органических катионов позволило оценить размер селективного фильтра каналов. Диаметр селективного фильтра $сгас$ -каналов оказался равным 0,6 нм (Kerschbaum, Cahalan, 1998), что соответствует таковому для потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов.

В настоящее время очевидно, что опустошение Ca^{2+} -депо приводит к активации входа Ca^{2+} . В то же время, природа этих депо и количественные взаимоотношения между степенью заполнения депо и активацией входа Ca^{2+} остаются неясными.

Кроме IP_3 -чувствительных депо, невозбудимые клетки содержат также рианодин-чувствительные депо и депо, чувствительные к новому внутриклеточному мессенджеру сфингозин-1-фосфату (Mattie et al., 1994). Активация $I_{сгас}$ связана, по-видимому, с опустошением IP_3 -чувствительных депо. Амплитуда $I_{сгас}$, вызванного IP_3 , не может быть далее увеличена при опустошении IP_3 -нечувствительных депо при действии иономицина (Parekh, Penner, 1996).

Где в цитозоле локализованы IP_3 -чувствительные Ca^{2+} депо, активирующие $I_{сгас}$? В этой связи следует отметить работы, выполненные на лейкоцитах базофилов линии RBL с использованием метода пэтч-кламп в конфигурации "whole-cell" и флуоресцентных методов измерения $[Ca^{2+}]$, (Parekh, Penner, 1995). Показано, что сульфгидрильный реагент тимеросал (1 мкМ), увеличивающий чувствительность IP_3 -рецепторов к IP_3 , может активировать $I_{сгас}$ в отсутствие IP_3 в патч-пипетке. Активация $I_{сгас}$ предотвращается ингибитором IP_3 -рецепторов гепарином. Интересно, что тимеросал может полностью активировать $I_{сгас}$ даже после диализа клеток в течение 900 с растворами, не содержащими экзогенного IP_3 . В этих условиях общая концентрация IP_3 в цитозоле должна быть очень низкой. Известно, что время жизни IP_3 в цитозоле составляет 1 с (Kasai, Petersen, 1994) и он может диффундировать из клетки с постоянной скоростью 30 с. Тот факт, что тимеросал может активировать $I_{сгас}$ в этих условиях, свидетельствует о том, что IP_3 -рецепторы и, следовательно, Ca^{2+} -депо, на которые действует тимеросал, должны реагировать на концентрацию IP_3 в несколько сотен наномолей. Это возможно только в том случае, если депо расположены рядом с участками образования IP_3 . Так как продукция IP_3 происходит в плазматической мембране, можно предположить, что Ca^{2+} -депо, активирующие $I_{сгас}$, также расположены около плазматической мембраны (Parekh, Penner, 1995).

Далее эти же авторы (Parekh et al., 1997) показали, что можно функционально разделить мобилизацию Ca^{2+} из депо и депо-зависимый вход Ca^{2+} по их чувствительности к IP_3 . Обнаружено, что низкие концентрации IP_3 (60–600 нМ) вызывают только мобилизацию Ca^{2+} из депо и не активируют $I_{сгас}$. Для активации $I_{сгас}$ необходимы микромолярные концентрации IP_3 . Предполагают, что существует по меньшей мере два типа функционально различных IP_3 -чувствительных депо: одни участвуют в освобождении Ca^{2+} , а другие отвечают главным образом за активацию входа Ca^{2+} . Депо, вызывающие активацию $I_{сгас}$, характеризуются низкой чувствительностью к IP_3 , по-видимому, из-за активного метаболизма, который быстро снижает концентрацию свободного IP_3 , воспринимаемую IP_3 -рецепторами этих депо. Логично предположить, что эти депо расположены в непосредственной близости к плазматической мембране (Parekh, Penner, 1995; Parekh et al., 1997), что свидетельствует в пользу модели конформационного связывания.

В ряде работ обнаружено также, что активация $I_{\text{сгас}}$, вызываемая агонистами или IP_3 , является высоко нелинейным процессом, происходящим в узкой области концентраций. Это свидетельствует о том, что активация $I_{\text{сгас}}$ является, по-видимому, процессом, работающим по принципу "все или ничего" (Parekh et al., 1997; Huang, Putney, 1998).

В последнее время разработаны методы одновременной регистрации активности сгас-каналов (в режиме пэтч-кламп в конфигурации "whole cell") и концентрации Ca^{2+} в ЭР с помощью зонда Mag-Fura 2-AM (Hofer et al., 1998). Обнаружено, что с помощью нового проникающего через мембрану Ca^{2+} -хелатора N, N, N', N'-тетраки (2-пиридилметил) этилендиамина (TPEN) можно фиксировать концентрацию Ca^{2+} в депо на любом заданном уровне в течение 10-15 с, не влияя на активность Ca^{2+} -насосов или каналов Ca^{2+} -выброса. Показано, что: 1) $I_{\text{сгас}}$ активируется исключительно при уменьшении концентрации свободного Ca^{2+} в депо; 2) амплитуда $I_{\text{сгас}}$ коррелирует со степенью опустошения депо; 3) не существует порога опустошения депо для активации $I_{\text{сгас}}$. Более того, обнаружено, что кинетика инактивации $I_{\text{сгас}}$ относительно медленная и зависит, по-видимому, от растворимых факторов, которые теряются при работе в режиме "whole cell". По мнению авторов, отсутствие порога активации и медленная скорость инактивации $I_{\text{сгас}}$ не согласуются с моделями, предполагающими белок-белковые взаимодействия, и свидетельствуют о существовании относительно медленного метаболического этапа, ответственного за включение и выключение емкостного входа Ca^{2+} (Hofer et al., 1998).

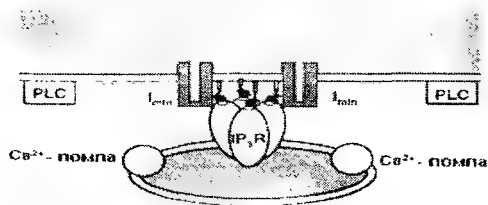
Основным Ca^{2+} -связывающим белком во внутриклеточных депо невозбудимых клеток является кальретикулин. При экспрессии кальретикулина в L фибробластах наблюдается увеличение содержания Ca^{2+} в тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и существенное подавление депо-зависимого входа Ca^{2+} , вызванного тапсигаргином (Mery et al., 1996). Предполагают, что кальретикулин активно участвует в регуляции емкостного входа Ca^{2+} в клетки.

В плазматической мембране клеток эпидермоидной карциномы A431 (Kiselyov et al., 1997b) и перитонеальных макрофагов мыши (Kiselyov et al., 1997a; Семенова и др., 1998) идентифицированы Ca^{2+} -каналы, прямо активируемые IP_3 . Авторы назвали эти каналы I_{mini} (miniature Ca^{2+} channels). Каналы имеют очень низкую проводимость (1 пСм), высокую селективность для Ca^{2+} относительно K^+ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{K}} > 1000$); вероятность их открытого состояния возрастает при гиперполяризации мембраны. Указанные свойства отличают эти каналы от IP_3 -активируемых каналов ЭР, но позволяют отнести их к семейству сгас-каналов. С другой стороны, IP_3 -чувствительные каналы в плазматической мембране исследованных клеток имеют свойства, характерные для IP_3 -рецептора ЭР: дозо-зависимость эффекта IP_3 , IP_3 -зависимую

десенситизацию рецептора, чувствительность к блокирующему действию гепарина и арахидоновой кислоты. Предполагают, что IP_3 -активируемые Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране могут непосредственно регулироваться IP_3 -рецептором в мембране ЭР. IP_3 -рецептор связывается с IP_3 , изменяет конформацию и передает сигнал с ЭР к высокоселективному Ca^{2+} -каналу в плазматической мембране (Семенова и др., 1998). Эта точка зрения согласуется с моделью "конформационного связывания".

А

Состояние покоя



В

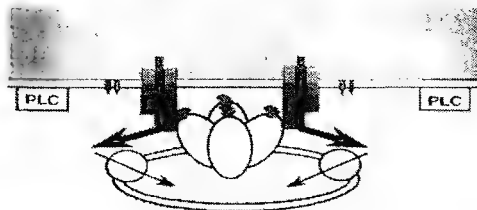
 Ca^{2+} - ВХОД

Рис. 40. Модель функционального связывания Ca^{2+} -канала (I_{min}) с комплексом IP_3 -рецептор (IP_3R) - PIP_2 .

А. В состоянии покоя популяция IP_3 -рецепторов, расположенных под плазмалеммой, образует ингибиторный комплекс с PIP_2 , локализованным в плазматической мембране. Эти IP_3 -рецепторы прямо или опосредованно связаны также с Ca^{2+} -каналами (I_{min}) в плазмалемме. В. Стимуляция клеток агонистами вызывает активацию фосфолипазы С (PLC), расщепление связи IP_3 -рецептор - PIP_2 , образование IP_3 и изменение конформации IP_3 -рецептора. Изменение конформации IP_3 -рецептора приводит к активации Ca^{2+} -каналов (I_{min}) и входу Ca^{2+} в клетку (по Kaznacheyeva et al., 2000).

Далее эти же авторы на клетках A431 показали, что $I_{\min}$ в мембранных фрагментах "inside-out" действительно регулируется IP_3 -рецепторами, входящими в состав микросом мозжечка крысы, и блокируется соединением SKF 95365, ингибирующим $I_{\text{сгас}}$ (Zubov et al., 1999). Полученные данные свидетельствуют о сходстве между $I_{\min}$ и $I_{\text{сгас}}$ -каналами и являются веским аргументом в пользу модели "конформационного связывания".

На мембранных фрагментах "inside-out" клеток A431 обнаружено также, что активность $I_{\min}$ существенно возрастает в присутствии антитела к PIP_2 и уменьшается при добавлении PIP_2 (Kaznacheyeva et al., 2000). Предполагают, что активация $I_{\min}$ в клетках A431 происходит путем их прямого конформационного связывания с определенной популяцией IP_3 -рецепторов, расположенных под плазматической мембраной, и связанных с PIP_2 (рис. 40).

В пользу модели "конформационного связывания" свидетельствуют также данные, полученные на клетках линии НЕК 293 с использованием метода пэтч-кламп и молекулярно-биологических методов (Kiselyov et al., 1998). Авторы экспрессировали в клетках НЕК 293 Htrp 3-белки, образующие депо-зависимые Ca^{2+} -каналы (Zhu et al., 1996). Показано, что Htrp 3-каналы находятся в тесном функциональном взаимодействии с IP_3 -рецепторами. Htrp 3-каналы активируются Ca^{2+} -мобилизующими агонистами в интактных клетках или приложением IP_3 к мембранным фрагментам "inside-out". Активирующее влияние IP_3 на Htrp 3-каналы блокируется гепарином или проникающим через мембрану ингибитором IP_3 -рецепторов ксестоспонгином С. Обнаружено также, что активирующее действие IP_3 на Htrp 3-каналы исчезает при длительном отмывании мембранных фрагментов, но может быть восстановлено при добавлении нативных или рекомбинантных IP_3 -рецепторов, связанных с IP_3 . Полученные данные свидетельствуют в пользу модели конформационного связывания, в соответствии с которой IP_3 -рецепторы, активированные IP_3 , взаимодействуют с депо-зависимыми Ca^{2+} -каналами (Kiselyov et al., 1998). В последующей работе эти авторы показали, что для активации Htrp 3-каналов важен N-терминальный (IP_3 -связывающий) домен IP_3 -рецептора (Kiselyov et al., 1999).

5.3.2.4. Молекулярная природа депо-зависимых Ca^{2+} -каналов

До настоящего времени $I_{\text{сгас}}$ -каналы все еще не клонированы и ничего не известно о структурных компонентах канала, отвечающих за селективность и воротные функции.

Исследование механизмов передачи сигналов в фоторецепторах *Drosophila* позволило предположить, что белок, кодируемый геном *itr*, может являться компонентом депо-зависимого Ca^{2+} -канала,

активируемого при опустошении Ca^{2+} -депо, вызванном световым стимулом (Hardie, Minke, 1992, 1993). Методами молекулярного клонирования показано, что *trp*-канал имеет поразительное сходство по аминокислотной последовательности с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами (Phillips et al., 1992). *Trp*-канал представляет собой белок из 1275 аминокислот, включает шесть трансмембранных сегментов (S1-S6) и соответствует одному гомологичному домену α_1 -субъединицы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа (рис. 41). Сегменты S3-S6 и участок SS1-SS2, соединяющий сегменты S5 и S6 и участвующий в образовании поры *trp*-канала, в высокой степени гомологичны таковым потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Однако сегмент S4, выполняющий функцию сенсора напряжения в потенциал-зависимых каналах (Hille, 1992; Mori et al., 1996; Hille, 2001), в *trp*-канале не содержит положительно заряженных аминокислот. *Trp*-белок содержит длинный, богатый пролином C-терминальный фрагмент. Предполагают, что уникальный богатый пролином участок на гидрофильном C-конце молекулы может взаимодействовать с IP_3 -рецептором (Vaca et al., 1994). Кроме того, обнаружено, что этот богатый пролином участок может обеспечивать чувствительность к тапсигаргину (Sinkins et al., 1996).

Гомологи *trp*-каналов идентифицированы в тканях человека (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995, 1996), мыши (Petersen et al., 1995) и ооциты *Xenopus* (Petersen et al., 1995). Предполагают, что гомологи *trp*-канала могут являться субъединицами депо-зависимых Ca^{2+} -каналов у позвоночных животных (Hardie, Minke, 1993; Berridge, 1995a; Petersen et al., 1995; Birnbaumer et al., 1996; Friel, 1996; Zhu et al., 1996). По аналогии с потенциал-зависимыми K^+ -каналами, депо-зависимые Ca^{2+} -каналы, образованные *trp*-белками, могут представлять собой тетрамеры (Zhu et al., 1996; Zhu, Birnbaumer, 1998).

В настоящее время клонировано 7 генов млекопитающих (*trp* 1-7), гомологичных *trp* (Birnbaumer et al., 1996; Zhu et al., 1996; Zhu, Birnbaumer, 1998; Putney, 1999b; Putney, Mc Kay, 1999; Harteneck et al., 2000; Clapham et al., 2001; Minke, Cook, 2002; Montell et al., 2002). Так же, как *trp*-белок, гомологи *trp* у млекопитающих содержат 6 трансмембранных сегментов и фрагмент, участвующий в образовании поры канала. Трансмембранные сегменты и 50 аминокислот, следующих за S6 сегментом, являются наиболее консервативными у белков семейства *trp*. N-терминальный фрагмент включает от 329 до 374 аминокислот и также довольно консервативен. Гомологи *trp*-белков, идентифицированные в тканях млекопитающих, так же, как и *trp*, имеют на консервативном цитоплазматическом N-конце три-четыре анкирин-подобных домсена (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1996; Putney, 1997; Zhu, Birnbaumer, 1998; Putney, Mc Kay, 1999). Эти домены могут участвовать в связывании *trp*-белков со структурами цитоскелета.

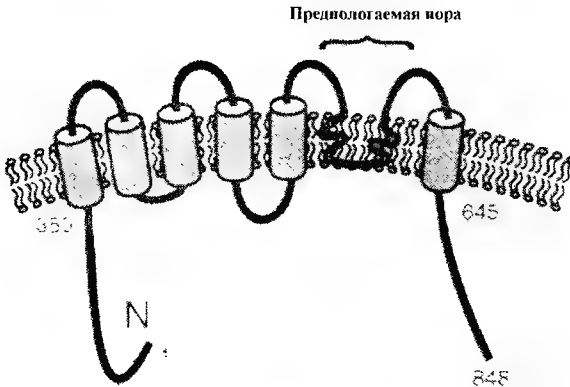
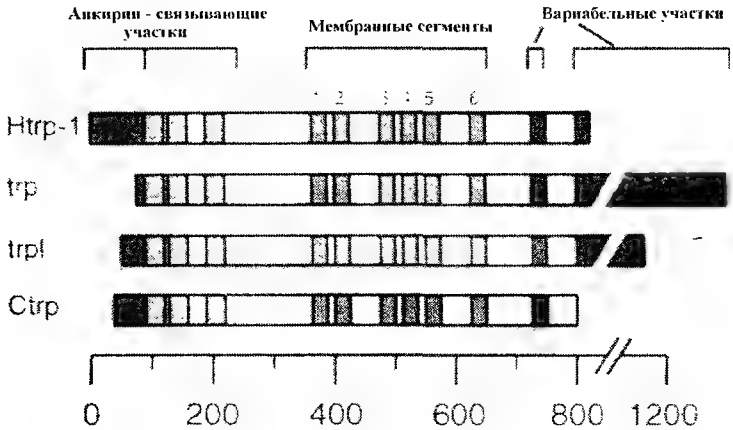


Рис. 41. Предполагаемая доменная структура белков семейства trp.

В нижней части рисунка представлена топология в мембране мономерного trp белка. Показаны 6 трансмембранных сегментов и фрагмент, участвующий в образовании поры trp-канала (по Putney, 1997).

Экспрессия этих генов млекопитающих в различных клеточных линиях показала, что trp 1, trp 4 и trp 5 работают как депо-зависимые Ca^{2+} -каналы (Philipp et al., 1996; Zhu, Birnbaumer, 1998; Putney, Mc Kay, 1999), в то время как trp 3 и trp 6 по-видимому функционируют как Ca^{2+} -

активируемые или рецептор-активируемые каналы (Boulay et al., 1997; Putney, Mc Kay, 1999). Биофизические характеристики trp 4- и trp 5-белков наиболее близки к таковым $I_{\text{сгac}}$ (Philipp et al., 1996). Так, экспрессия trp 4 в клетках линии НЕК 293 приводит к появлению токов входящего выпрямления, активируемых GTPγS, IP_3 или тапсигаргином. Так же, как и $I_{\text{сгac}}$, эти токи высоко селективны для двухвалентных катионов по отношению к одновалентным катионам ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 7:1$); повышение $[\text{Ca}^{2+}]$, приводит к ингибированию токов (Philipp et al., 1996).

С помощью методов иммунопреципитации показано прямое физическое взаимодействие между trp3-каналом и IP_3 -рецептором (Boulay et al., 1999). Обнаружено, что во взаимодействии этих белков участвует С-терминальный домен (аминокислоты 742-795) trp 3-канала и фрагмент из 289 аминокислот (аминокислоты 638-926) IP_3 -рецептора. Экспрессия в клетках НЕК 293 trp 3-белков показала, что trp 3-белки работают как депо-зависимые Ca^{2+} -каналы, прямо активируемые IP_3 -рецепторами (Boulay et al., 1999).

Кроме того, экспрессия в клетках линии НЕК-293 trp 3-белков показала, что trp3-белок входит в состав мультимолекулярного сигнального комплекса, содержащего белки плазматической мембраны и ЭР, играющие ключевую роль в процессах Ca^{2+} -сигналикации (Lockwich et al., 2001). Trp3-содержащий сигнальный комплекс связан с кавеוליном-1 и локализован в кавеолах. В состав этого комплекса входят фосфолипаза С, гетеротримерный G-белок ($G_{q/11}$), Trp3, IP_3 -рецептор, SERCA Ca^{2+} -АТФаза, кавеолин-1, эзрин (рис. 42). Показано, что конденсация кортикального актина при действии каликулина А или джасплакинолида приводит к ингибированию входа Ca^{2+} и интернализации Trp3-содержащего комплекса (Trp3, $G_{q/11}$, фосфолипаза С, кавеолин-1). После обработки каликулином А кавеола, содержащая сигнальные белки, отшнуровывается от плазматической мембраны и интернализуется по механизму, включающему актиновые филаменты (рис. 42). Интересно, что после обработки каликулином А взаимодействие Trp3 и IP_3 -рецептора не нарушается. Предполагают, что актиновые филаменты, по-видимому, влияют на локализацию Trp3-содержащего сигнального комплекса, а не на связь Trp3 и IP_3 -рецептора (Lockwich et al., 2001).

На клетках подчелюстных желез человека обнаружено, что Trp1-белок также входит в состав большого сигнального комплекса, локализованного в кавеолах. Комплекс включает: Trp1, гетеротримерный G-белок ($G_{q/11}$), IP_3 -рецептор, кавеолин-1 (Lockwich et al., 2000) (рис. 43).

В последнее время клонирован Ca^{2+} -транспортирующий белок (CaT1), обеспечивающий транспорт Ca^{2+} в эпителиальных клетках кишечника (Peng et al., 1999). CaT1 имеет структурное сходство с trp-семейством ионных каналов (рис. 44). Также как и trp-белки, CaT1

содержит 6 трансмембранных сегментов и анкирин-подобные домены на цитоплазматическом N-конце (Peng et al., 1999).

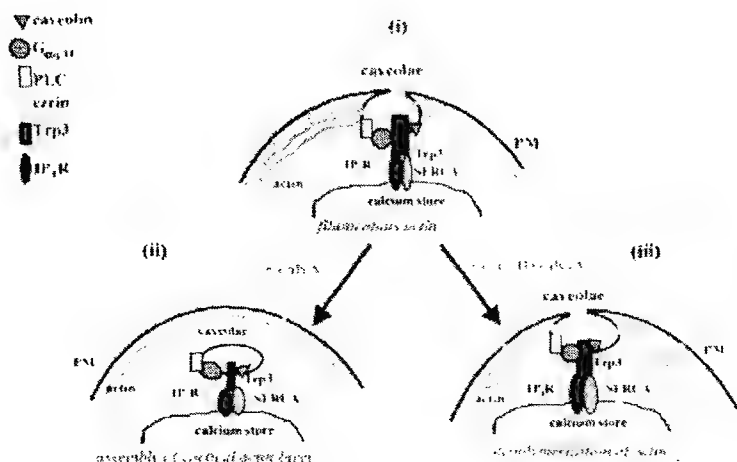


Рис. 42. Влияние реорганизации актиновых филаментов на локализацию Tgr3-содержащего сигнального комплекса.

- Tgr3-сигнальный комплекс локализован в кавеоле. В состав мультимолекулярного комплекса входит: фосфолипаза C, гетеротримерный G-белок ($G_{q/11}$), Tgr3, IP_3 -рецептор, SERCA Ca^{2+} -АТФаза, кавеолин-1, эзрин.
- При воздействии каликулина А происходит конденсация кортикального актина; кавеола, содержащая сигнальный комплекс, отшнуровывается от плазматической мембраны и интернализуется в клетку. Связь между Tgr3 и IP_3 -рецептором сохраняется.
- Агенты, вызывающие деполимеризацию актина (цитохалазин В), препятствуют интернализации кавеолы (по Lockwich et al., 2001).

Обнаружено, что CaT1, экспрессированный в яйцеклетках китайского хомячка, проявляет уникальные биофизические

характеристики сгас-каналов (Yue et al., 2001). Также как и сгас-канал, CaT1 имеет высокую селективность для Ca^{2+} , блокируется лантаном, инактивируется при повышении $[\text{Ca}^{2+}]_i$, активируется при пассивном и активном опустошении Ca^{2+} -депо, в бескальциевой среде пропускает одновалентные катионы, проводимость одиночного канала для Na^+ 42-58 пСм. Предполагают, что CaT1 представляет собой пору (или часть поры) сгас-канала (Yue et al., 2001).

Воетс и соавторы (Voets et al., 2001) провели сравнение биофизических и фармакологических характеристик CaT1, экспрессированного в клетках почки эмбрионов человека (HEK-293), и эндогенного сгас-канала в RBL-клетках крысы. Авторы подтвердили сходство функциональных характеристик CaT1 и сгас-канала, однако обнаружили и ряд отличий. Так, в отличие от сгас-каналов, CaT1 активируется, а не ингибируется блокаторм IP_3 -рецепторов 2-аминоксидифенилборатом; ингибируется потенциал-зависимым образом внутриклеточными ионами Mg^{2+} . Эти данные свидетельствуют о том, что поры CaT1 и сгас-канала не являются полностью идентичными (Voets et al., 2001).

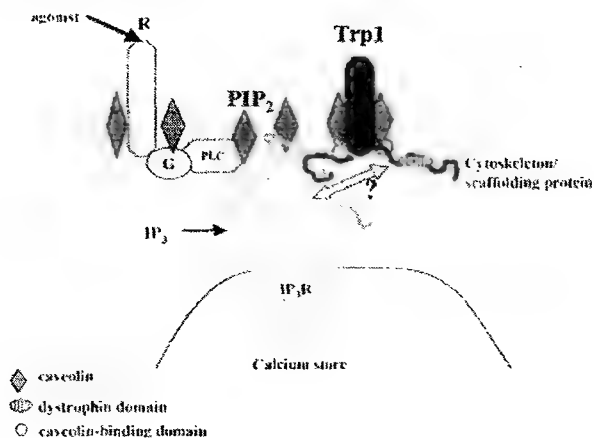


Рис. 43. Локализация Trp1-содержащего сигнального комплекса в кавеоле.

R - рецептор; G - G-белок; PLC - фосфолипаза C; PIP_2 - фосфатидилинозитол-4, 5-дифосфат; IP_3R - IP_3 -рецептор; A - анкирин-подобный домен белка Trp1. Стрелкой с вопросом показано взаимодействие между IP_3 -рецептором и Trp1-белком (по Lockwich et al., 2000).

Клонирование гомологов *trp*-белков у млекопитающих ознаменовало новый период в выяснении молекулярных основ емкостного входа Ca^{2+} в клетки. Однако несмотря на впечатляющие успехи, достигнутые в изучении белков *trp*-семейства, роль гомологов *trp* у млекопитающих в осуществлении депо-зависимого входа Ca^{2+} остается неясной. Можно надеяться, что использование комплекса молекулярно-биологических и биофизических методов будет способствовать идентификации депо-зависимых Ca^{2+} -каналов, а также выяснению их физиологической значимости. Установление субъединичной структуры депо-зависимых Ca^{2+} -каналов может быть также полезным для выяснения природы сигнала от опустошенных Ca^{2+} -депо, так как депо-зависимый Ca^{2+} -канал является мишенью для этого сигнала.

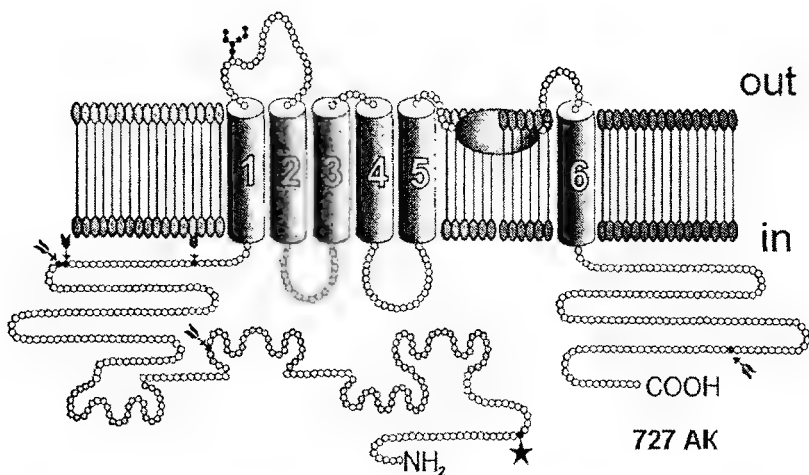


Рис. 44. Топология в мембране CaT1-белка, имеющего структурное сходство с *trp*-белками (Peng et al., 1999).

5.3.2.5. Функциональная роль депо-зависимого входа Ca^{2+}

Емкостной вход Ca^{2+} является главным, если не единственным, механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в "классических" невозбудимых клетках, таких как эпителиальные клетки и клетки крови. Депо-зависимый вход Ca^{2+} играет ключевую роль во многих процессах

клеточной сигнализации: восполнении опустошенных внутриклеточных Ca^{2+} -депо; генерации Ca^{2+} -осцилляций и Ca^{2+} -волн; регуляции активности ферментов, таких как аденилатциклаза и фосфолипаза A_2 ; регуляции процессов фототрансдукции в фоторецепторах *Drosophila*; активации процессов митогенеза в лимфоцитах и фибробластах; регуляции роста и дифференцировки клеток; активации апоптоза. В клетках крови депо-зависимый вход Ca^{2+} имеет принципиальную значимость для выполнения многих важных функций, таких как секреция и хемотаксис (Putney, 1997, 2001).

5.3.2.6. Возможная роль депо-зависимого входа Ca^{2+} в различных патологических процессах

В настоящее время известно мало патологических состояний, которые связаны с нарушением депо-зависимого входа Ca^{2+} . Так, показано, что в Т-лимфоцитах, выделенных из больных наследственной формой иммунодефицита, мобилизация Ca^{2+} из депо происходит нормально, а депо-зависимый вход Ca^{2+} не наблюдается (Partiseti et al., 1994; Le Deist et al., 1995). Как неоднократно отмечалось, длительное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ токсично для клеток. Поэтому агенты, которые увеличивают емкостной вход Ca^{2+} прямо или опосредованно (вызывая мобилизацию Ca^{2+} из депо), оказывают пагубное влияние на функционирование клеток. Существует большое количество данных о роли депо-зависимого входа Ca^{2+} в программируемой гибели клеток (апоптозе). Показано, что длительная (в течение 10-18 часов) обработка клеток ингибиторами Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопiazониковой кислотой, активирующими депо-зависимый вход Ca^{2+} , приводит к апоптозу (Tsukamoto, Kaneko, 1993; Bian et al., 1997). Блокаторы Ca^{2+} -каналов предотвращают апоптоз. Обнаружено также, что тапсигаргиноподобный эффект могут иметь многие токсины, продукты окружающей среды, такие как трибутилтин (Chow et al., 1992). Например, полициклические ароматические соединения, образующиеся при сгорании топлива, являются ингибиторами Ca^{2+} -АТФаз и действуют подобно тапсигаргину. Эти агенты являются карциногенами и иммунодепрессантами (Davila et al., 1995). Показано также, что слабые электромагнитные поля увеличивают вход Ca^{2+} в клетки и приводят к лейкемии (Putney, 1997). В связи с этим становится понятной необходимость жесткой регуляции входа Ca^{2+} в клетки. Ингибиторы депо-зависимого входа Ca^{2+} могут использоваться в клинической практике. В настоящее время ингибиторы депо-зависимого входа Ca^{2+} используются в основном для лечения воспалительных процессов и лечения рака. Так, тенидап (ингибитор циклооксигеназ), блокирующий емкостной вход Ca^{2+} , используется в клинике для лечения ревматоидного артрита. Клотримазол

(антимикотический агент, блокирующий эпоксигеназы или цитохром P-450-подобные ферменты), также ингибирующий депо-зависимый вход Ca^{2+} , используется для лечения рака (Putney, 1997, 2001).

5.4. Механизмы Ca^{2+} -сигналикации в перитонеальных макрофагах

Фагоцитирующие клетки (макрофаги, нейтрофилы) отвечают на воздействие разнообразных агонистов, быстро гидролизуя мембранные фосфолипиды, что приводит к генерации большого числа внутриклеточных и экстраклеточных мессенджеров. Одним из наиболее ранних событий, запускаемых в этих клетках при воспалительных реакциях, является активация сигнальных путей с участием фосфоинозитид-специфической фосфолипазы C и фосфолипазы A_2 , что играет ключевую роль в запуске или модуляции хемотаксиса, секреции, фагоцитоза, образования супероксидов (Snyderman, Uhing, 1992).

В связи с этим, нам представлялось целесообразным с использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2 AM исследовать механизмы генерации и регуляции Ca^{2+} -сигналов и в первую очередь входа Ca^{2+} в таком удобном объекте как перитонеальные макрофаги при их активации пуринергическими агонистами (АТФ, УТФ) и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз (тапсигаргин, циклопiazониковая кислота (ЦПК)). Связывание АТФ или УТФ с пуринорецепторами типа P_{2u} приводит к активации фосфоинозитидного цикла и вызывает двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, в макрофагах. В качестве первой фазы выступает кратковременная мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Вторая фаза, более длительная, связана с входом Ca^{2+} из наружной среды, обусловленным, по-видимому, опустошением депо. Экзогенная АТФ может также активировать лиганд-управляемые Ca^{2+} -каналы пуринорецепторов P_{2x} -типа. Специфические ингибиторы эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин или ЦПК также вызывают двухфазный Ca^{2+} -сигнал: достаточно быстрый пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и длительную фазу, отражающую депо-зависимый вход Ca^{2+} из наружной среды (Крутецкая и др., 2000).

Выявлены фармакологические характеристики депо-зависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги. Показано, что депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином или УТФ, подавляется следующими фармакологическими агентами: двумя структурно различными ингибиторами потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов нифедипином и верапамилом; неорганическими блокаторами: ионами Ni^{2+} , La^{3+} , Gd^{3+} ; блокатором неселективных катионных каналов нифлумовой кислотой. Полученные данные свидетельствуют о том, что

депо-зависимые Ca^{2+} -каналы в перитонеальных макрофагах крысы по фармакологическим характеристикам сходны с Ca^{2+} -каналами L-типа. Подобно trp -каналам *Drosophila* они могут напоминать Ca^{2+} -каналы L-типа, не имеющие сенсора напряжения (Крутецкая и др., 1997 в).

Вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги регулируется тирозинкиназами и тирозинфосфатазами. Впервые установлено, что два структурно различных ингибитора тирозинкиназ генистейн и метил-2,5-дигидроксициннамат ингибируют вход Ca^{2+} , индуцируемый АТФ, УТФ, тапсигаргином или ЦПК. Фаза мобилизации Ca^{2+} из депо остается без изменения. Генистин, структурный аналог генистейна, не способный ингибировать тирозинкиназы, не влияет на параметры Ca^{2+} -сигналов, вызываемых пуринаргическими агонистами и ингибиторами Ca^{2+} -АТФаз. Ингибитор тирозинфосфатаз ортованадат Na увеличивает вход Ca^{2+} , индуцируемый этими агентами, но не предотвращает ингибирующее действие генистейна (Крутецкая и др., 1997 а). Ингибиторы тирозинфосфатаз фениларзиноксид, H_2O_2 , N-этилмалеимид вызывают дозо-зависимое увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, которое связано как с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо, так и с активацией входа Ca^{2+} из наружной среды. В регуляции вызываемых ингибиторами тирозинфосфатаз Ca^{2+} -ответов участвуют тирозинкиназы, продукты циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты, а также такие элементы цитоскелета как микротрубочки и актиновые микрофиламенты. Полученные данные позволяют сделать вывод, что динамический баланс между активностью тирозинкиназ и тирозинфосфатаз может играть центральную роль в поддержании внутриклеточного Ca^{2+} гомеостаза как в покоящихся клетках, так и при действии агонистов (Крутецкая и др., 1997 б).

В процессах функциональной активации макрофагов важную роль играют арахидоновая кислота (АК) и продукты ее метаболизма. Вход Ca^{2+} в макрофаги, индуцированный пуринаргическими агонистами или ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, подавляется ингибитором фосфолипазы A_2 4-бромфенацилбромидом, ингибиторами циклооксигеназ (индометацин, аспирин) и ингибиторами липоксигеназ (нордигидрогуаретиковая кислота, байкалейн, каффеиновая кислота). Это позволяет предположить, что метаболиты циклооксигеназного и липоксигеназного пути окисления АК могут участвовать в регуляции входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги. Ингибиторы эпоксигеназ эконазол и проадифен оказывают множественное влияние на процессы Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах. Кроме ингибирования входа Ca^{2+} , эти имидазольные соединения в более высоких концентрациях индуцируют также мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо. Анализ наших результатов, а также последних литературных данных позволяет предположить, что эконазол и проадифен могут

непосредственно блокировать каналы входа Ca^{2+} (Крутецкая и др., 1998 в).

АК и другие свободные жирные кислоты оказывают множественное влияние на процессы Ca^{2+} -сигналикации в перитонеальных макрофагах крысы. Цис-полиненасыщенные жирные кислоты АК и линолевая кислота вызывают значительное и дозо-зависимое увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и входом Ca^{2+} из наружной среды. Вход Ca^{2+} в макрофаги, активируемый АК, по фармакологическим характеристикам сходен с депо-зависимым входом Ca^{2+} , активируемым тапсигаргином или ЦПК: подавляется теми же блокаторами Ca^{2+} -каналов, ингибитором тирозинкиназ генистейном, ингибитором эпоксигеназ проадифеном. Цис-мононенасыщенная олеиновая и насыщенная миристиновая кислоты действуют менее эффективно и вызывают лишь незначительное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в существенно более высоких концентрациях. АК и другие жирные кислоты также активируют, по-видимому, Ca^{2+} -АТФазу в плазмалемме макрофагов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что АК и другие свободные жирные кислоты играют важную роль в регуляции внутриклеточного кальциевого обмена в перитонеальных макрофагах (Крутецкая и др., 2001 б).

В регуляции Ca^{2+} -ответов в перитонеальных макрофагах принимает участие протеинкиназа С. Активация протеинкиназы С фторболовым эфиром РМА приводит к подавлению обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцированных АТФ, УТФ или тапсигаргином. Фаза мобилизации Ca^{2+} из депо подавляется на 20-40 %, в то время, как фаза входа Ca^{2+} ингибируется практически полностью. Ингибитор протеинкиназы С (соединение Н-7) предотвращает ингибирующее действие РМА. Полученные данные свидетельствуют о важной роли протеинкиназы С в регуляции Ca^{2+} -сигналов в перитонеальных макрофагах (Крутецкая и др., 1998 б).

В регуляции Ca^{2+} -сигналов в макрофагах участвует аденилатциклазная система. Агенты, повышающие внутриклеточную концентрацию цАМФ (форсколин, теофиллин, простагландин E_2), подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызванных АТФ, УТФ, тапсигаргином или ЦПК. Наблюдается практически полное подавление входа Ca^{2+} в клетку и существенное (на 20-30 %) уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Таким образом, в перитонеальных макрофагах, как и в других клетках крови, наблюдается антагонизм в действии факторов, активирующих аденилатциклазную и фосфоинозитидную системы (Крутецкая и др., 2000).

Процессы Ca^{2+} -сигналикации в макрофагах регулируются гуанилатциклазной системой. Агенты, повышающие внутриклеточную концентрацию цГМФ (нитроглицерин, нитропруссид Na), существенно

уменьшают фазу мобилизации Ca^{2+} из депо и практически полностью подавляют вход Ca^{2+} , индуцированные пуринаргическими агонистами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. Нитроглицерин и нитропруссид Na также существенно ускоряют спад фазы мобилизации Ca^{2+} из депо при действии АТФ или УТФ. Ускорение спада Ca^{2+} -ответов может быть связано с активацией Ca^{2+} -АТФаз в плазматической мембране и в мембране внутриклеточных депо. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация цГМФ играет важную роль в регуляции Ca^{2+} гомеостаза в перитонеальных макрофагах крысы (Крутецкая и др., 2000).

В генерации и регуляции Ca^{2+} -ответов в макрофагах принимают участие гетеротримерные G-белки. Специфический активатор гетеротримерных G-белков комплекс AlF_4^- приводит к мобилизации Ca^{2+} из депо и подавляет обе фазы Ca^{2+} -сигналов, вызванных АТФ, УТФ, тапсигаргином или ЦПК. Кроме того, AlF_4^- ингибирует уже развившийся вход Ca^{2+} , индуцированный пуринаргическими агонистами и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. Возможно, что гетеротримерные G-белки могут прямо модулировать каналы входа Ca^{2+} . Однако, с учетом того, что в наших экспериментах активация протеинкиназы А и протеинкиназы С оказывает существенное влияние на вход Ca^{2+} в макрофаги, нельзя также исключить возможность опосредованного влияния G-белков, действующих путем стимуляции этих протеинкиназ (Крутецкая и др., 2000).

Вход Ca^{2+} в макрофаги зависит от состояния энергетического метаболизма клеток. Ингибиторы окислительного метаболизма митохондрий олигомицин и FCCP практически полностью подавляют вход Ca^{2+} в макрофаги, индуцированный АТФ, УТФ или тапсигаргином. В связи с тем, что зависимость входа Ca^{2+} от уровня энергизации обнаружена на разных типах клеток, его можно рассматривать как общий механизм регуляции входа Ca^{2+} в физиологических условиях. Ингибирование входа Ca^{2+} при уменьшении концентрации АТФ и/или увеличении концентрации АДФ может быть полезным для предотвращения массивного повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и гибели клетки (Крутецкая и др., 1998 а).

Впервые выявлена важная роль структур цитоскелета в активации и регуляции депо-зависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги. Агенты, нарушающие структуру микротрубочек (винбластин, колхицин, колцемид) и актиновых микрофиламентов (цитохалазины, фаллоидин), практически полностью подавляют депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргином или ЦПК. Следовательно, для нормального функционирования механизма депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофаги необходима интактность цитоскелетного аппарата макрофагов (Крутецкая и др., 2001 а).

Таким образом, нами впервые показана сложная, множественная зависимость Ca^{2+} -сигналов и, в первую очередь, входа Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы от активности различных систем вторичных посредников и функционального состояния других ключевых систем клетки (митохондрии, цитоскелет) (Крутецкая и др., 2000). Именно фаза входа Ca^{2+} является чрезвычайно чувствительной к действию различных факторов. Поддержание кальциевого гомеостаза - тонкий, сложный и хорошо отрегулированный процесс, в котором принимают участие многочисленные Ca^{2+} -транспортирующие системы, расположенные в различных мембранах клетки. Учитывая большой градиент концентрации ионов Ca^{2+} между внешней средой и цитозолем и то, что массиванный вход Ca^{2+} в клетки может представлять опасность для их жизнедеятельности, неудивительно, что системы входа ионов Ca^{2+} должны очень жестко регулироваться. Ингибирование входа Ca^{2+} при малейших изменениях в состоянии различных систем клетки может служить важным тормозящим фактором, предотвращающим создание чрезмерно высокой внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Суммарная схема процессов Ca^{2+} -сигналикации в перитонеальных макрофагах представлена на рис. 45.

5.5. Заключение по разделу 5

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что за последние годы достигнуты значительные успехи в понимании процессов восприятия клетками внешних сигналов. Прогресс в изучении механизмов Ca^{2+} -сигналикации в клетках заключается в понимании природы двух фаз формирования Ca^{2+} -сигнала - мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо и входа Ca^{2+} из наружной среды. Ca^{2+} является универсальным вторичным мессенджером, участвующим практически во всех процессах, протекающих в живой клетке. Ca^{2+} необходим для жизнедеятельности клеток, и в то же время чрезмерное повышение $[\text{Ca}^{2+}]$, приводит к гибели клеток. Образно говоря, ионы Ca^{2+} являются сигналом для жизни и смерти клетки (life and death signal) (Berridge et al., 1998). Эта двоякая роль Ca^{2+} в клетке на протяжении многих лет интересует исследователей.

В настоящее время достаточно хорошо изучены механизмы мобилизации Ca^{2+} из депо, описаны функциональные характеристики и механизмы регуляции каналов Ca^{2+} -выброса в мембране внутриклеточных депо. Однако механизмы входа Ca^{2+} в невозбудимые клетки далеки от полного понимания. Предполагают, что одним из главных механизмов регулируемого входа Ca^{2+} в невозбудимые клетки является депо-зависимый или емкостной вход Ca^{2+} (Putney, 1990; Berridge, 1995a; Putney, 1997). Однако механизм, посредством которого информация об

опустошении Ca^{2+} -депо передается от ЭР к Ca^{2+} -каналам в плазматической мембране, а также молекулярная природа депо-зависимых Ca^{2+} -каналов остаются неясными. На решение этих проблем и направлены основные усилия исследователей в последние годы.

Авторы выражают благодарность С.Н. Бутову, П.И. Курилову и другим коллегам, принимавшим участие в проведении и техническом обеспечении экспериментов и подготовке рукописи к изданию.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского Фонда Фундаментальных исследований N 97-04-48915 и N 00-04-48960.

6. Список литературы

Авдонин П.В., Ткачук В.А. 1994. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М., Наука, 288 с.

Бакалова Р.А., Некрасов А.С., Ланкин В.З., Каган В.Е., Стойчев Ц.С., Евстигнеева Р.П. 1988. Механизм ингибирующего действия α -токоферола и его синтетических производных на окисление линолевой кислоты, катализируемое липоксигеназой из ретикулоцитов. ДАН СССР. 299 (4): 1008-1011.

Костюк П.Г. 1986. Кальций и клеточная возбудимость. М., 255 с.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 1992а. Метаболизм фосфоинозитидов и формирование кальциевого сигнала в клетках. Цитология. 34 (10): 26-44.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 1992б. Структурно-функциональная организация G-белков и связанных с ними рецепторов. Цитология. 34 (11/12): 24-45.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 1993. Арахидоновая кислота и ее продукты: пути образования и метаболизма в клетках. Цитология. 35 (11/12): 3-35.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 1995. Модуляция активности ионных каналов клеток арахидоновой кислотой, продуктами ее метаболизма и другими жирными кислотами. Цитология. 37 (1/2): 5-65.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 1998. Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. СПб, Айю, 244 с.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 2000а. Структурно-функциональная организация сигнальных систем в клетках. Цитология. 42(9): 844-874.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 2000б. Структурно-функциональная организация и механизмы регуляции потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов клеток. СПб. Изд. СПбГУ. 37 с.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. 2001. Механизмы Ca^{2+} сигнализации в клетках. Цитология. 43(1): 5-32.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. 1998 а. Влияние ингибиторов окислительного метаболизма митохондрий на Ca -ответы, индуцированные пуринергическими агонистами и тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 40 (1): 94-100.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. 1998 б. Роль протеинкиназы С в регуляции Ca -ответов, индуцированных пуринергическими агонистами и тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 40 (5): 445-454.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. 2000. Механизмы Ca^{2+} -сигнализации в перитонеальных макрофагах. Рос. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 86(8): 1030-1048.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Рощина Н.Г. 1994. Влияние 4-бромфенилбромид на калиевые каналы выходящего выпрямления в мембране перитонеальных макрофагов мыши. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 80 (8): 102-107.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Рощина Н.Г., Бутов С.Н. 1995а. K^{+} -каналы выходящего выпрямления в мембране перитонеальных макрофагов крысы: модуляция докозатриеновой кислотой. В кн. "Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов". Воронеж, ВГУ: 77-80.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Рощина Н.Г., Бутов С.Н. 1995б. Влияние докозатриеновой кислоты на калиевые каналы выходящего выпрямления в мембране перитонеальных макрофагов крысы. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 81 (7): 111-119.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Петрова Т.В. 1997б. Ингибитор тирозинфосфатаз фениларзиноксид индуцирует увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы и фибробластах человека. Цитология. 39 (12): 1116-1130.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Петрова Т.В. 1997в. Органические и неорганические блокаторы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов ингибируют депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. Цитология. 39 (12): 1131-1141.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Тюшев В.Е., Крутецкая Н.И., Рощина Н.Г. 1997а. Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на вход Ca^{2+} , индуцируемый АТФ и тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 39 (2/3): 164-176.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Булкин Н.В., Ченцов И.Г. 1998 в. Роль продуктов метаболизма арахидоновой кислоты в регуляции рецептор- и депо-зависимого входа ионов Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. В кн.: "Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов". Воронеж. ВГУ: 116-121.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Курилова Л.С. 2001 а. Роль структур цитоскелета в регуляции Ca^{2+} -ответов в макрофагах. Цитология. 43(1): 61-71.

Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Курилова Л.С. 2001 б. Влияние арахидоновой и других жирных кислот на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и формирование Ca^{2+} -сигналов в перитонеальных макрофагах. Цитология. 43 (11): 1051-1060.

Крутецкая З.И., Лонский А.В. 1994. Биофизика мембран. СПб, Изд. СПбГУ, 288 с.

Лебедев О.Е., Крутецкая З.И. 1994. Механизмы трансмембранной передачи сигналов в клетках. Санкт-Петербург. 75 с.

Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. 1993. Биохимия человека. М., Мир, 1: 381 с.

Плеснева С.А., Кузнецова Л.А., Шпаков А.О., Перцева М.Н. 1996. Участие рецепторной тирозинкиназы в механизме стимулирующего аденилатциклазу действия инсулина и некоторых ростовых факторов. В: материалах I(XI) международного совещания по эволюционной физиологии. СПб: 181-182.

Семенова С.Б., Киселев К.И., Можеева Г.Н. 1998. Кальциевые каналы низкой проводимости в плазматической мембране макрофагов: активация инозитол (1, 4, 5)-трифосфатом. Российский Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 84 (5-6): 417-425.

Ходоров Б.И. 1975. Общая физиология возбудимых мембран. М., 406 с.

Шпаков А.О. 1996. Участки цитоплазматического "хвоста" инсулинового рецептора, потенциально включенные во взаимодействие с гетеротримерными G-белками. В: материалах I(XI) международного совещания по эволюционной физиологии. СПб: 272-273.

Abernethy D.R., Soldatov N.M. 2002. Structure-functional diversity of human L-type Ca^{2+} -channel: perspectives for new pharmacological targets. J. Pharm. Exper. Therap. 300: 724-728.

Ackermann E.J., Conde-Frieboes K., Dennis E.A. 1995. Inhibition of macrophage Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by brompenol lactone and trifluoromethyl ketones. J. Biol. Chem. 270: 445-450.

Ackermann E.J., Kempner E.S., Dennis E.A. 1994. Ca^{2+} -independent cytosolic phospholipase A_2 from macrophage-like P 388D₁ cells. Isolation and characterization. J. Biol. Chem. 269: 9227-9233.

Adams D.O., Hamilton Th.A. 1984. The cell biology of macrophage activation. Annu. Rev. Immunol. 2: 283-318.

Adarem A.A., Cohn Z.A. 1988. Calcium ionophore synergizes with bacterial lipopolysaccharides in activating macrophage arachidonic acid metabolism. J. Exp. Med. 167: 623.

Aderem A. 1992. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. Trends Biochem. Sci. 17: 438-443.

Aghdasi B., Zhang J.-Zh., Wu Y., Reid M.B., Hamilton S.L. 1997. Multiple classes of sulfhydryls modulate the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. J. Biol. Chem. 272: 3739-3748.

Ahern G.P., Junankar P.R., Pace S.M., Curtis S., Mould J.A., Dulhunty A.F. 1999. Effects of ivermectin and miconazole on ryanodine receptors and the Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum of rabbit and rat skeletal muscle. J. Physiol. 514.2: 313-326.

Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S.-I., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595.

Akiyama T., Ogawara H. 1991. Use and specificity of genistein as an inhibitor of protein tyrosine kinases. *Methods Enzymol.* 201: 362-370.

Allbritton N.L., Meyer T., Stryer L. 1992. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science.* 258: 1812-1815.

Allbritton N.L., Oancea E., Kuhn M.A., Meyer T. 1994. Source of nuclear calcium signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12458-12462.

Alonso M.T., Barrero M.J., Camicero E., Montero M., Garcia-Sancho J., Alvarez J. 1998. Functional measurements of $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum using a herpes virus to deliver targeted aequorin. *Cell Calcium.* 24: 87-96.

Alonso G., Koegl M., Mazurenko N., Courtneidge S.A. 1995. Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 270: 9840-9848.

Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. 1991. Cytochrome P-450 may link intracellular Ca^{2+} stores with plasma membrane Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 274: 193-197.

Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. 1992. Cytochrome P450 may regulate plasma membrane Ca^{2+} permeability according to the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores. *FASEB J.* 6: 786-792.

Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. 1999. Subcellular Ca^{2+} dynamics. *News Physiol. Sci.* 14: 161-168.

Anderson R.G.W. 1998. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 199-225.

Ando M., Furui H., Suzuki K., Taki F., Takagi K. 1992. Direct activation of phospholipase A_2 by GTP-binding protein in human peripheral polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 708-713.

Ashman G., Lipton R., Melicow M., Price T. 1963. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11: 330-334.

Audigier Y., Journot L., Pantaloni C., Bockaert J. 1990. The carboxy-terminal domain of G_{α} is necessary for anchorage of the activated form in the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 111: 1427-1435.

Axelrod J. 1990. Receptor-mediated activation of phospholipase A_2 and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 503-507.

Axelrod J., Burch R.M., Jelsema C.L. 1988. Receptor-mediated activation of phospholipase A_2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *Trends Neur. Sci.* 11: 117-123.

- Babcock D.F., Herrington J., Goodwin P.C., Park Y.B., Hille B. 1997. Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J. Cell Biology*. 136: 833-844.
- Babcock D.F., Hille B. 1998. Mitochondrial oversight of cellular Ca^{2+} signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 398-404.
- Bading H., Greenberg M.E. 1991. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science*. 253: 912-914.
- Bahnson T.D., Pandol S.J., Dionne V.E. 1993. Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca^{2+} entry in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268: 10808-10812.
- Bairoch A., Cox J.A. 1990. EF-hand motifs in inositol phospholipid-specific phospholipase C. *FEBS Lett.* 269: 454-456.
- Balboa M.A., Balsinde J., Winstead M.V., Tischfield J.A., Dennis E.A. 1996. Novel group V phospholipase A_2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P 388 D 1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 271: 32381-32384.
- Balch W.E. 1990. Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem. Sci.* 15: 473-477.
- Balsinde J., Fernandes B., Dies E. 1990. Regulation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages. The role of extracellular calcium and protein kinase C. *J. Immunol.* 144: 4298-4304.
- Balsinde J., Fernandez B., Solis-Herruzo J.A., Diez E. 1992. Pathways for arachidonic acid mobilization in zimosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochim. biophys. acta.* 1136: 75-82.
- Barbour S., Dennis E.A. 1993. Antisense inhibition of group II phospholipase A_2 expression blocks the production of prostaglandin E_2 by P388D1 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 21875-21882.
- Barford D., Flint A.J., Tonks N.K. 1994. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*. 263: 1397-1404.
- Barrero M.J., Montero M., Alvarez J. 1997. Dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 272: 27694-27699.
- Baylor S.M., Hollingworth S. 2000. Measurement and interpretation of cytoplasmic Ca^{2+} signals from calcium-indicator dyes. *News Physiol. Sci.* 15: 19-26.
- Bennett D.L., Cheek T.R., Berridge M.J., De Smedt H., Parys J.B., Missiaen L., Bootman M.D. 1996. Expression and function of ryanodine receptors in non-excitabile cells. *J. Biol. Chem.* 11: 6356-6362.
- Berridge M.J. 1984. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- Berridge M.J. 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-193.

- Berridge M.J. 1990. Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265: 9583-9586.
- Berridge M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361: 315-325.
- Berridge M.J. 1995a. Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 312: 1-11.
- Berridge M.J. 1995b. Calcium signalling and cell proliferation. *Bio Essays*. 17: 491-500.
- Berridge M.J. 1997a. Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Exper. Biol.* 200: 315-319.
- Berridge M.J. 1997b. The AM and FM of calcium signalling. *Nature*. 386: 759-760.
- Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. 1998. Calcium - a life and death signal. *Nature*. 395: 645-648.
- Berridge M.J., Irvine R.F. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 312: 315-321.
- Berridge M.J., Irvine R.F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 341: 197-205.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. 2000. The calcium entry pas de Deux. *Science*. 287: 1604-1605.
- Beurg M., Sukhareva M., Ahern C.A., Conklin M.W., Perez-Reyes E., Powers P.A., Gregg R.G., Coronado R. 1999. Differential regulation of skeletal muscle L-type Ca^{2+} current and excitation-contraction coupling by the dihydropyridine receptor β subunit. *Biophys. J.* 76: 1744-1756.
- Bevan S., Wood J.N. 1987. Arachidonic acid metabolites as second messengers. *Nature*. 328: 20.
- Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. 1991. Bell-shaped calcium response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 351: 751-754.
- Bezprozvanny I., Ehrlich B.E. 1994. Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP_3)-gated Ca^{2+} channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J. Gen. Physiol.* 104: 521-568.
- Bezprozvanny I., Ehrlich B.E. 1995. The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP_3) receptor. *J. Membr. Biol.* 145: 205-216.
- Bian X., Hughes F.M., Huang Y., Cidlowski J.A., Putney J.W. 1997. Roles of cytoplasmic Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am. J. Physiol.* 272: C1241-C1249.
- Bigay J., Deterre P., Pfister D., Chabre M. 1987. Fluororide complexes of aluminium or berillium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the γ -phosphate of GTP. *EMBO J.* 6: 2907-2913.
- Bird G.S., Bian X., Putney J.W. 1995. Calcium entry signal? *Nature*. 373: 481-482.

Bird G.S., Burgess G.M., Putney J.W. 1993. Sulfhydryl reagents and cAMP-dependent kinase increase the sensitivity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 17917-17923.

Bird G.S.J., Putney J.W. 1993. Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. *J. Biol. Chem.* 268: 21486-21488.

Birnbaumer L., Abramovitz J., Brown A.M. 1990a. Receptor-effector coupling by G-proteins. *Biochim. biophys. acta.* 1031: 163-224.

Birnbaumer L., Abramovitz J., Yatani A., Okabe K., Mattera R., Graf R., Sanford J., Codina J., Brown A.M. 1990b. Roles of G-proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 225-244.

Birnbaumer L., Yatani A., Codina J., Uan Dongen A., Graf R., Mattera R., Sanford J., Brown A.M. 1989. Multiple roles of G-proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effectors. *Mol. Mech. Horm. Act. Berlin:* 147-177.

Birnbaumer L., Zhu X., Jiang M., Boulay G., Peyton M., Vannier B., Brown D., Platano D., Sadeghi H., Stefani E., Birnbaumer M. 1996. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 15195-15202.

Bischof G., Illek B., Reenstra W.W., Machen T.E. 1995. Role for tyrosine kinases in carbachol-regulated Ca entry into colonic epithelial cells. *Amer. J. Physiol.* 268: C154-C161.

Bitonti A.J., Moss J., Tandon N.N., Vaughan M. 1980. Prostaglandins increase GTP hydrolysis by membranes from human mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 255: 2026-2029.

Black Sh.D. 1992. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J.* 6: 680-685.

Block B.A. 1994. Thermogenesis in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 535-577.

Bochaert J., Homburger V., Rouot B. 1987. GTP binding proteins: a Key role in cellular communication. *Biochimie.* 69: 329-338.

Bolen J.B., Brugge J.S. 1997. Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 371-404.

Boonstra J., Rijken Ph., Humbel B., Cremers F., Verkleij A., Van Bergen en Henegouwen P. 1995. The epidermal growth factor. *Cell Biology International.* 19: 413-430.

Bootman M.D., Berridge M.J., Lipp P. 1997. Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events. *Cell.* 91: 367-373.

Boulay G., Brown D.M., Quin N., Jiang M., Dietrich A., Zhu M.X., Chen Z., Birnbaumer M., Mikoshiba K., Birnbaumer L. 1999. Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R)

that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14955-14960.

Boulay G., Zhu X., Peyton M., Jiang M., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L. 1997. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* Transient Receptor Potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G_q class of G protein. *J. Biol. Chem.* 272: 29672-29680.

Bourguignon L., Chu A., Brandt N. R. 1995. Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca^{2+} release in mouse T-lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 270: 17917-17922.

Bourguignon L., Iida N., Jin H. 1993b. The involvement of the cytoskeleton in regulating IP₃ receptor-mediated internal Ca^{2+} release in human blood platelets. *Cell Biol. Int.* 17: 751-758.

Bourguignon L., Jin H. 1995. Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell IP₃ receptor and its role in the regulation of IP₃-mediated internal Ca^{2+} release. *J. Biol. Chem.* 270: 7257-7260.

Bourguignon L., Jin H., Iida N., Brandt N. R., Zhang S. H. 1993a. The involvement of ankyrin in the regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediated internal Ca^{2+} release from Ca^{2+} storage vesicles in mouse T-lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 268: 7290-7297.

Brillantes A.-MB., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Ondriasova E., Moschella M.C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B.E., Marks A.R. 1994. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK-506 binding protein. *Cell.* 77: 513-523.

Broad L.M., Armstrong D.L., Putney J.W. 1999. Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate in Ca^{2+} feedback inhibition of calcium release-activated calcium current (I_{crac}). *J. Biol. Chem.* 274: 32881-32888.

Brooks R.C., Mc Carthy K.D., Lapetina E.G., Morell P. 1989. Receptor-stimulated phospholipase A₂ activation is coupled to influx of external calcium and not to mobilization of intracellular calcium in C62B glioma cells. *J. Biol. Chem.* 264: 20147-20153.

Brown A.M., Birnbaumer L. 1988. Direct G protein gating of ion channels. *Amer. J. Physiol.* 23: H401 - H410.

Brown D.A., London E. 1998a. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 111-136.

Brown D.A., London E. 1998b. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* 164: 103-114.

Brown G.P., Monick M.M., Hunninghake G.W. 1988. Human alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Amer. J. Physiol.* 254: C809-C815.

Bull R., Marengo J.J., Suarez-Isla B.A., Donoso P., Sutko J.L., Hidalgo C. 1989. Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentration of ryanodine. *Biophys. J.* 56: 749-756.

Burch R.M. 1987. Protein kinase C mediates endotoxin and zymozan-induced prostaglandin synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 142: 431.

Burch R.M. 1990. G protein regulation of phospholipase A₂: partial reconstitution of the system in cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 279: 185-195.

Burgoyne R.D., Cheek T.R., O'Sullivan A.J. 1987. Receptor-activation of phospholipase A₂ in cellular signaling. *Trends Biochem. Sci.* 12: 332-333.

Buser C.A., Sigal C.T., Resh M.D., McLaughlin S. 1994. Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH₂ terminus of src. *Biochemistry.* 33: 13093-13101.

Buss J.E., Mumby S.M., Casey P.J., Gilman A.G., Sefton B.M. 1987. Myristoylated α subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84: 7493-7497.

Byczkowski J.Z., Ramgoolie P.J., Kulkarni A.P. 1992. Some aspects of activation and inhibition of rat brain lipoxygenase. *Int. J. Biochem.* 24: 1691-1695.

Cadena D.L., Gill G.N. 1992. Receptor tyrosine kinases. *FASEB J.* 6: 2332-2337.

Cameron A.M., Steiner J.P., Sabatini D.M., Kaplin A.I., Walensky L.D., Snyder S.H. 1995. Immunophilin FK 506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 1784-1788.

Camps M., Hou C., Sidiropoulos D., Stock J.B., Jakobs K.H., Gierschik P. 1992. Stimulation of phospholipase C by guanine nucleotide-binding protein $\beta\gamma$ -subunits. *Eur. J. Biochem.* 206: 821-831.

Cannell M.B., Cheng H., Lederer W.J. 1995. The control of Ca²⁺ release in heart muscle. *Science.* 268: 1045-1049.

Capdevila J., Gil L., Orellana M., Marnett L.J., Mason J.J., Yadagiri P., Falck J.R. 1988. Inhibitors of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 261: 257-263.

Carter T.D., Hallam T.J., Pearson J.D. 1989. Protein kinase C activation alters the sensitivity of agonist-stimulated endothelial-cell prostacycline production to intracellular Ca²⁺. *Biochem. J.* 262: 431-437.

Caselli A., Marzocchini R., Camici G., Manao G., Moneti G., Pieraccini G., Ramponi G. 1998. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 273: 32554-32560.

Casnellie J.E. 1991. Protein kinase inhibitors: probes for the functions of protein phosphorylation. *Adv. Pharmacol.* 22: 167-205.

Cassola A.C., Jaffe H., Fales H.M., Afeche S.C., Magnoli F., Cipolla-Neto J. 1998. ω -Phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflügers Arch.* 436: 545-552.

Catterall W.A. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science.* 242: 50-61.

Catterall W.A. 1993. Structure and modulation of Na^+ and Ca^{2+} channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 707: 1-19.

Catterall W.A. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 493-531.

Catterall W.A. 1996. Molecular properties of Na^+ and Ca^{2+} channels. *J. Bioenergetics and Biomembranes.* 28: 219-230.

Catterall W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 521-555.

Cens T., Dalle C., Charnet P. 1998. Expression of β subunit modulates surface potential sensing by calcium channels. *Pflügers Arch.* 435: 865-867.

Chang J., Musser J.H., McGregor H. 1987. Phospholipase A_2 : function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2429-2436.

Channon J.Y., Leslie C.C. 1990. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonyl-hydrolyzing phospholipase A_2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J. Biol. Chem.* 265: 5409-5413.

Chen J., Devivo M., Dingus J., Harry A., Li J., Sui J., Carty D.J., Blank J.L., Exton J.H., Stoffel R.H. et al. 1995. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science.* 268: 1166-1169.

Chen J., Engle S.J., Seilhamer J.J., Tischfield J.A. 1994a. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca^{2+} -dependent phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 269: 2365-2368.

Chen J., Engle S.J., Seilhamer J.J., Tischfield J.A. 1994b. Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A_2 . *Biochim. biophys. acta.* 1215: 115-120.

Chiba T., Nagata Y., Machide M., Kishi A., Amanuma H., Sugiyama M., Todokoro K. 1993. Tyrosine kinase activation through the extracellular domains of cytokine receptors. *Nature.* 362: 646-648.

Chiono M., Mahey R., Tate G., Cooper D. M.F. 1995. Capacitative Ca^{2+} entry exclusively inhibits cAMP synthesis in C62B glioma cells. Evidence that physiologically evoked Ca^{2+} entry regulates Ca^{2+} -inhibitable adenylyl cyclase in non-excitabile cells. *J. Biol. Chem.* 270: 1149-1155.

Chow S.C., Jondal M. 1990. Polyunsaturated free fatty acids stimulate an increase in cytosolic Ca^{2+} by mobilising the inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in T cells through a mechanism independent of phosphoinositide turnover. *J. Biol. Chem.* 265: 902-907.

Chow S.C., Kass C.E.N., McCabe M.J., Orrenius J. 1992. Tributyltin increases cytosolic free Ca^{2+} concentration in thymocytes by mobilizing

intracellular Ca^{2+} , activating a Ca^{2+} entry pathway, and inhibiting Ca^{2+} efflux. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 143-149.

Chun M., Liyanage U.K., Lisanti M.D., Lodish H.F. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11728-11732.

Clapham D.E. 1993. A mysterious new influx factor? *Nature.* 364: 763-764.

Clapham D.E. 1995a. Calcium signaling. *Cell.* 80: 259-268.

Clapham D.E. 1995b. Intracellular calcium: replenishing the stores. *Nature.* 375: 634-635.

Clapham D.E., Runnels L.W., Strubing C. 2001. The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 387-396.

Clark J.D., Lin L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N., Knopf J.L. 1991. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA contains a Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* 65: 1043-1051.

Clark J.D., Milona N., Knopf J.L. 1990. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A_2 from the human monocytic cell line U937. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 87: 7708-7712.

Clementi E. 1998. Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca^{2+} homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* 55: 713-718.

Clementi E., Vecchio I., Sciorati C., Nistico G. 1995a. Nitric oxide modulation of agonist-evoked intracellular Ca^{2+} release in neurosecretory PC-12 cells: inhibition of phospholipase C activity via cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Mol. Pharmacol.* 47: 517-524.

Clementi E., Sciorati C., Riccio M., Miloso M., Meldolesi J., Nistico G. 1995b. Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. *J. Biol. Chem.* 270: 22277-22282.

Cockcroft Sh. 1987. Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, G_p . *TIBS.* 12: 75-78.

Coghlan V.M., Perrino B.A., Howard M., Langeberg L.K., Hicks J.B., Gallatin W.M., Scott J.D. 1995. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science.* 267: 108-111.

Cohn Z.A. 1978. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J. Immunol.* 121: 813-816.

Cooper D.M.F., Mons N., Karpen J.W. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature.* 374: 421-424.

Courtneidge S.A., Dhand R., Pilat D., Twamley G.M., Waterfield M.D., Roussel M. 1993. Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *EMBO J.* 12: 943-950.

Cribbs L.L., Gomora J.C., Daud A.N., Lee J.-H., Pérez-Reyes E. 2000. Molecular cloning and functional expression of $\text{Ca}_v3.1c$, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett.* 466: 54-58.

Crooke S.T., Bennet C.F. 1989. Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C isoenzymes. *Cell Calcium.* 10: 309-323.

Dackiw A.P., Grinstein S., Brisseau G.F., McGilvray I.D., Nathens A.B., McGuire J.A., Romanek R., Cheung P.Y., Rotstein O.D. 1997. The role of tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide- and zymosan- induced procoagulant activity and tissue factor expression in macrophages. *Infect. Immun.* 6: 2362-2370.

Danielsen A.G., Liu F., Hosomi Y., Shii K., Roth R.A. 1995. Activation of protein kinase C α inhibits signaling by members of the insulin receptor family. *J. Biol. Chem.* 270: 21600-21605.

Dascal N. 1990. Analysis and functional characteristics of dihydropyridine-sensitive and -insensitive calcium channel proteins. *Biochem. Pharmacol.* 40: 1171-1178.

Davies Ph., Bailey Ph.J., Goldberg M.M. 1984. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2: 335-357.

Davies E.V., Hallett M.B. 1995. A soluble cellular factor directly stimulates Ca^{2+} entry in neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 348-354.

Davis M.J., Wu X., Nurkiewicz T.R., Kawasaki J., Gui P., Hill M.A., Wilson E. 2001. Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 281: H1835-H1862.

Davila D.R., Davis D.P., Campbell K., Cambier J.C., Zigmond A., Burchiel S.W. 1995. Role of alterations in Ca^{2+} -associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Toxicol. Env. Hlth.* 45: 101-126.

Dell'Acqua M.L., Scott J.D. 1997. Protein kinase A anchoring. *J. Biol. Chem.* 272: 12881-12884.

DeLisle S., Marksberry E.W., Bonnett C., Jenkins D.J., Potter B.V.L., Takahashi M., Tanzawa K. 1997. Adenophostin A can stimulate Ca^{2+} influx without depleting the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores in the *Xenopus* oocyte. *J. Biol. Chem.* 272: 9956-9961.

Demaurex N., Lew D.P., Krause K.-H. 1992. Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca^{2+} stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 267: 2318-2324.

Dennis E.A. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 269: 13057-13060.

Dennis E. A. 1997. The growing phospholipase A_2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 22: 1-2.

Denu J. M., Stuckey J. A., Saper M. A., Dixon J.E. 1996. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*. 87: 361-364.

De Waard M., Liu H.Y., Walker D., Scott V.E., Gurnett C.A., Campbell K.P. 1997. Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*. 385: 446-450.

De Waard M., Pragnell M., Campbell K.P. 1994. Ca^{2+} channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron*. 13: 495-503.

De Weille J.R., Schweitz H., Maes P., Tartar A., Lazdunski M. 1991. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 2437-2440.

De Witt D.L., El Harish E.A., Kraemer S.A., Andrews M.J., Yao E.F., Armstrong R.L., Smith W.L. 1990. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Biol. Chem.* 265: 5192-5198.

Dhar A., Shukla S.D. 1994. Electroporation of pp60v-src monoclonal antibody inhibits activation of phospholipase C in platelets. *J. Biol. Chem.* 269: 9123-9127.

Dieter P., Fitzke E. 1993. Formation of diacylglycerol, inositol phosphates, arachidonic acid and its metabolites in macrophages. *Eur. J. Biochem.* 218: 753-758.

Dieter P., Peters T., Schulze-Specking A., Decker K. 1989. Independent regulation of thromboxane and prostaglandin synthesis in liver macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1577.

Diez E., Mong S. 1990. Purification of a phospholipase A_2 from human monocytic leukemic U937 cells. Calcium-dependent activation and membrane association. *J. Biol. Chem.* 265: 14654-14661.

Dohi T., Anamura S., Shirakawa M., Okamoto H., Tsujimoto A. 1991. Inhibition of lipoxygenase by phenolic compounds. *Jap. J. Pharmacol.* 55: 547-550.

Dolphin A.C. The G.L. 1995. Brown prize lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exper. Physiol.* 80: 1-36.

Dolphin A.C. 1998. Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J. Physiol.* 506.1: 3-11.

Drummond R.M., Mix T.C.H., Tuft R.A., Walsh J.V., Fay F.S. 2000. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis during Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release in gastric myocytes from *Bufo marinus*. *J. Physiol.* 522.3: 375-390.

Drummond R.M., Tuft R.A. 1999. Release of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Physiol.* 516.1: 139-147.

Duchen M.R. 1999. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol.* 516.1: 1-17.

Dumonteil E., Barre A.H., Meissner G. 1993. Potential role of palmitoyl carnitine modulation of the avian Ca^{2+} release channel in muscular nonshivering thermogenesis. *Biophys. J.* 64: A304.

Eager K.R., Dulhunty A.F. 1998. Activation of the cardiac ryanodine receptor by sulphydryl oxidation is modified by Mg^{2+} and ATP. *J. Membrane Biol.* 163: 9-18.

Eager K.R., Dulhunty A.F. 1999. Cardiac ryanodine receptor activity is altered by oxidizing reagents in either the luminal or cytoplasmic solution. *J. Membrane Biol.* 167: 205-214.

Eible H., Blume A. 1979. The influence of charge on phosphatidic acid bilayer membranes. *Biochim. biophys. acta.* 553: 476-488.

Eide B., Gierschik P., Milligan G., Mullaney I., Unson C., Goldsmith P., Spiegel A. 1987. GTP-binding proteins in brain and neutrophil are tethered to the plasma membrane via their amino termini. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 1398-1405.

Ellinor P.T., Zhang J.F., Horne W.A., Tsien R.W. 1994. Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature.* 372: 272-275.

El-Hayek R., Valdivia C., Valdivia H.H., Hogan K., Coronado R. 1993. Palmitoyl carnitine: activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by palmitoyl carnitine and related long chain fatty acid derivatives. *Biophys. J.* 65: 779-789.

Erpel T., Courtneidge S.A. 1995. Src family protein tyrosine kinases and cellular signal transduction pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 176-182.

Ertel E., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y. et al. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25: 533-535.

Ewart H.St., Klip A. 1995. Hormonal regulation of the Na^+/K^+ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Amer. J. Physiol.* 269: C295-C311.

Fagan K., Mahey R., Cooper D.M.F. 1996. Functional co-localization of transfected Ca^{2+} -stimulable adenylyl cyclases with capacitative Ca^{2+} entry sites. *J. Biol. Chem.* 271: 12438-12444.

Fagan K.A., Mons N., Cooper L.M.F. 1998. Dependence of the Ca^{2+} -inhibitable adenylyl cyclase of C6-2B glioma cells on capacitative Ca^{2+} entry. *J. Biol. Chem.* 273: 9297-9305.

Fan Z., Makielski J.C. 1999. Phosphoinositides decrease ATP sensitivity of the cardiac ATP-sensitive K^+ channel: a molecular probe for the mechanism of ATP-sensitive inhibition. *J. Gen. Physiol.* 114: 251-270.

Fantl W.J., Johnson D.E., Williams L.T. 1993. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 453-481.

Fasolato C., Hoth M., Penner R. 1993. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative Ca^{2+} influx. *J. Biol. Chem.* 268: 20737-20740.

Favero T.G., Zable A.C., Abramson J.J. 1995. Hydrogen peroxide stimulates the Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 25557-25563.

Fernando K.C., Barritt G.J. 1994. Evidence from studies with hepatocyte suspensions that store-operated Ca^{2+} inflow requires a pertussis toxin-sensitive trimeric G-protein. *Biochem. J.* 303: 351-356.

Ferreira M.C.d.J., Helies-Toussaint C., Imbert-Teboul M., Bailly C., Verbavatz J.-M., Bellanger A.-C., Chabardes D. 1998. Co-expression of a Ca^{2+} -inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca^{2+} -sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. *J. Biol. Chem.* 273: 15192-15202.

Fesenko E.E., Kolesnikov S.S., Lyubarsky A.L. 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature.* 313: 310-313.

Fierro L., Parekh A.B. 1999. Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (crac) in RBL-1 cells. *J. Membrane Biol.* 168: 9-17.

Finch E.A., Turner T.J., Goldin S.M. 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science.* 252: 443-446

Fincham V., Frame M., Haefner B., Unlu M., Wyke A., Wyke J. 1994. Functions of the v-src protein tyrosine kinase. *Cell Biol. Intern.* 18: 337-344.

Fischer E.H., Charbonneau H., Tonks N.K. 1991. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science.* 253: 401-406.

Fleming I., Fisslthaler B., Busse R. 1995. Calcium signalling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circ. Res.* 76: 522-529.

Fleming I., Fisslthaler B., Busse R. 1996. Interdependence of calcium signaling and protein tyrosine phosphorylation in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 11009-11015.

Ford-Hutchinson A. 1990. Regulation of the production of lipoxigenase products and the role of eicosanoids in signal transduction. *Biology of cellular transducing signals.* N.Y. London: Plenum Press. 353-357.

Francis Sh.H., Corbin J.D. 1994. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 237-272.

Friel D.D. 1996. TRP: its role in phototransduction and store-operated Ca^{2+} entry. *Cell.* 85: 617-619.

Fujimoto T. 1993. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell Biol.* 120: 1147-1157.

Fujimoto T., Miyawaki A., Mikoshiba K. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J. Cell Sci.* 108: 7-15.

Fujimoto T., Nakade S., Miyawaki A., Mikoshiba K., Ogawa K. 1992. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J. Cell Biol.* 119: 1507-1514.

Fukami K., Endo T., Imamura M., Takenawa T. 1994. α -actinin and vinculin are PIP_2 -binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 1518-1522.

Furuichi T., Yoshikawa S., Miyawaki A., Wada K., Maeda N., Mikoshiba K. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature.* 342: 32-38.

Gafni J., Munsch J.A., Lam T.H., Catlin M.C., Costa L.G., Molinski T.F., Pessah I.N. 1997. Xestospongins, potent membrane permeable blockers of the inositol 1, 4, 5 - trisphosphate receptor. *Neuron.* 19: 723-733.

Galvan D.L., Borrego-Diaz E., Perez P.J., Mignery G.A. 1999. Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 29483-29492.

Gao T., Chien A.J., Hosey M.M. 1999. Complexes of the α_{1c} and β subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 274: 2137-2144.

Gao B., Gilman A.G., Robishaw J.D. 1987. A second form of the β subunit of signal-transducing G proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84: 6122-6125.

Garcia-Cardena G., Fan R., Stern D.F., Liu J., Sessa W.C. 1996. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 271: 27237-27240.

Gazit A., Yaish P., Gilon C., Levitzki A. 1989. Tyrophostins 1: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 32: 2344-2352.

Geiger J., Nolte Ch., Butt E., Sage S.O., Walter U. 1992. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1031-1035.

Geiger J., Nolte Ch., Walter U. 1994. Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *Amer. J. Physiol.* 267: C236-C244.

Gerasimenko O.V., Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., Petersen O.H. 1996. Calcium transport pathways in the nucleus. *Pflugers Arch.* 432: 1-6.

Gerzer G., Brash A.R., Hardman J.G. 1986. Activation of soluble guanylate cyclase by arachidonic acid and 15-lipoxygenase products. *Biochim. biophys. acta.* 886: 383-389.

Gilman A.G. 1987. G-proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.

Gilon P., Bird G.S.J., Bian X., Yakel J.L., Putney J.W. 1995. The Ca^{2+} -mobilizing actions of a Jurkat cell extract on mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 8050-8055.

Giordano M., Geffner J.R., Prat A., Palermo M.S., Serebrinsky G.P., Isturiz M.A. 1988. Cyclophosphamide modulates arachidonic acid metabolism by peritoneal macrophages. *Int. J. Immunopharmac.* 10: 939-944

Glaser K.B., Lister M.D., Dennis E.A. 1990. Inhibition of phospholipase A_2 activation in P388 D1 macrophage-like cells. In: *Biology of cellular transducing signals*. N.Y.: Plenum Press, 281-287.

Glennay J.R. 1992. Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from the tyrosine kinases. *Biochim. biophys. acta.* 1134: 113-127.

Goeger D.E., Riley R.T., Dorner J.W., Cole R.J. 1988. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Pharmacol.* 37: 978-981.

Goldman R., Ferber E., Meller R., Zor U. 1994. A role for reactive oxygen species in zymosan and β -glucan induced protein tyrosine phosphorylation and phospholipase A_2 activation in murine macrophages. *Biochim. biophys. acta.* 1222: 265-276.

Goldschmidt-Clermont P., Kim J.W., Machesky L.M., Rhee S.G., Pollard T.D. 1991. Regulation of phospholipase $\text{C-}\gamma 1$ by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science.* 251: 1231-1233.

Goldsmith P., Backlund P.S., Rossiter K., Carter A., Milligan G., Unson C.G., Spiegel A. 1988. Purification of heterotrimeric GTP-binding proteins from brain: identification of a novel form of G_o . *Biochemistry.* 27: 7085-7090.

Gordon J.A. 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* 201: 477-482.

Gottesman M.M., Pastan I. 1988. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* 263: 12163-12166.

Graier W.F., Simecek S., Sturek M. 1995. Cytochrome P450 monooxygenase-regulated signaling of Ca^{2+} entry in human and bovine endothelial cells. *J. Physiol.* 482: 259-274.

Gray P.C., Tibbs V.C., Catterall W.A., Murphy B.J. 1997. Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 272: 6297-6302.

Graziani Y., Chayoth R., Karny N., Feldman B., Levy J. 1981. Regulation of protein kinases activity by quercetin in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. biophys. acta.* 714: 415-421.

Grimaldi M., Favit A., Alkon D.L. 1999. cAMP-induced cytoskeleton rearrangement increases calcium transient through the enhancement of capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.* 274: 33557-33564.

Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.

Gukovskaya A.S., Zinchenko V.P. 1990. Mechanisms of receptor-mediated generation of ionic signals in rat thymocytes and Ehrlich ascites tumor cells. *Sov. Sci. Rev. D. Physicochem. Biol.* 10: 1-98.

Gunter T.E., Gunter K.K., Sheu S.-S., Gavin C.E. 1994. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* 267: C313-C339.

Gurrola G.B., Arevalo C., Sreekumar R., Lokuta A.J., Walker J.W., Valdivia H.H. 1999. Activation of ryanodine receptors by imperatoxin A and a peptide segment of the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 274: 7879-7886.

Gustavsson J., Pappal S., Karlsson M., Ramsing C., Thorn H., Borg M., Lindroth M., Peterson K.H., Magnusson K.-E., Stralfors P. 1999. Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J.* 13: 1961-1971.

Hagiwara S., Takahashi K. 1967. Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. Gen. Physiol.* 50: 583-603.

Hagiwara N., Tohda H., Doi Y., O'Broovich H., Marunaka Y. 1992. Effects of insulin and tyrosine kinase inhibitor on ion transport in the alveolar cell of the fetal lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 802-808.

Hajjar D.P., Pomerantz K.B. 1992. Signal transduction in atherosclerosis: integration of cytokines and the eicosanoid network. *FASEB J.* 6: 2933-2941.

Hajnóczky G., Lin C., Thomas A.P. 1994. Luminal communication between intracellular calcium stores is modulated by GTP and the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 269: 10280-10287.

Hamasaki Y., Tai H.-H. 1985. Gossypol, a potent inhibitor of arachidonate 5- and 12-lipoxygenases. *Biochim. biophys. acta.* 834: 37-41.

Hamilton T.A., Adams D.O. 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunology Today.* 8: 151-158.

Hancock J.T. 1997. Cell signaling. Addison Wesley Longman. 210 P.

Hardie R.C., Minke B. 1992. The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptor cells. *Neuron.* 8: 643-651.

Hardie R.C., Minke B. 1993. Novel Ca^{2+} channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca^{2+} mobilization. *Trends Neurosci.* 16: 371-376.

Hardman J., Sutherland E. 1969. Guanylylcyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3', 5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 244: 6363-6370.

Harlan J.E., Hajduk P.J., Yoon H.S., Fesik S.W. 1994. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*. 371: 168-170.

Harms G.S., Cognet L., Lommerse P.H.M., Blab G.A., Kahr H. et al. 2001. Single-molecule imaging of L-type Ca^{2+} -channels in live cells. *Biophys. J.* 81: 2639-2646.

Harnick D.J., Jayaraman Th., Ma Y., Mulieri Ph., Go L.O., Marks A.R. 1995. The human type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270: 2833-2840.

Hartereck Ch., Plant T.D., Schultz G. 2000. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends in Neurosci.* 23: 159-166.

Hartwig J.H., Chambers K.A., Stossel T.P. 1989. Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J. Cell Biol.* 108: 467-479.

Hazarika P., Sheldon A., Kaetzel M.A., Diaz-Munoz M., Hamilton S.L., Dedman J.R. 1991. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel requires intact annexin VI. *J. Cell. Biochem.* 46: 86-93.

Hazlett T.L., Deems R.A., Dennis E.A. 1990. Activation, aggregation, inhibition and the mechanism of phospholipase A_2 . *Adv. Exp. Med. Biol.* 279: 49-64.

Hecht D., Zick. Y. 1992. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H_2O_2 and vanadate in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 773-779.

Hehl S., Golard A., Hille B. 1996. Involvement of mitochondria in intracellular calcium sequestration by rat gonadotropes. *Cell Calcium*. 20: 515-524.

Heldin C.H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 80: 213-223.

Hering S., Aczel S., Kraus R.L., Berjukow S., Striessnig J., Timin E.N. 1997. Molecular mechanism of use-dependent calcium channel block by phenylalkylamines: role of inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 13323-13328.

Herlitze S., Garcia D.E., Mackie K., Hille B., Scheuer T., Catterall W.A. 1996. Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature*. 380: 258-262.

Herlitze S., Hockerman G.H., Scheuer T., Catterall W.A. 1997. Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel α_{1A} subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 1512-1516.

Herrington J., Park Y.B., Babcock D.F., Hille B. 1996. Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron*. 16: 219-228.

Hess P., Lansman J.B., Tsien R.W. 1986. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. *J. Gen. Physiol.* 88: 293-319.

Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y. 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry.* 23: 5036-5041.

Hidaka H., Kobayashi R. 1992. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 377-397.

Hildebrandt J.D., Codina J., Risinger R., Birnbaumer L. 1984. Identification of a γ subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins N_s and N_i . *J. Biol. Chem.* 259: 2039-2042.

Hildebrandt J.D., Codina J., Rosenthal W., Birnbaumer L., Neer E., Yamazaki A., Bitensky M.W. 1985. Characterization by two-dimensional peptide mapping of the subunit composition of the regulatory N_s and N_i proteins of adenylyl cyclase, and transducin, the guanine nucleotide binding protein of retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* 260: 14867-14872.

Hille B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. 2nd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA. 607 p.

Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3rd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, USA. 725 p.

Hilly M., Pietri-Rouxel F., Coquil J.F., Guy M., Mauger J.P. 1993. Thiol reagents increase the affinity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 16488-16494.

Ho I.H.M., Murrell-Lagnado R.D. 1999. Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K^+ channels. *J. Physiol.* 520.3: 645-651.

Hockerman G.H., Johnson B.D., Scheuer T., Catterall W.A. 1995. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 270: 22119-22122.

Hofer A.M., Fasolato C., Pozzan T. 1998. Capacitative Ca^{2+} entry is closely linked to the filling state of internal Ca^{2+} stores: a study using simultaneous measurements of I_{Crac} and intraluminal $[Ca^{2+}]$. *J. Cell Biol.* 140: 325-334.

Hofmann F., Biel M., Flockerzi V. 1994. Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 399-418.

Holowka D., Baird B. 1992. Recent evidence for common signalling mechanisms among immunoreceptors that recognize foreign antigens. *Cellular Signalling.* 4: 339-349.

Holda J.R., Blatter L.A. 1997. Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett.* 403: 191-196.

Holda J.R., Klishin A., Sedova M., Huser J., Blatter L.A. 1998. Capacitative calcium entry. *News Physiol. Sci.* 13: 157-163.

Hosey M.M., Brawley R.M., Chang Ch.F., Gutierrez L.M., Mundina-Weilenmann C., Ma J., Rios E. 1992. Phosphorylation and regulation of calcium channels by multiple protein kinases. In: *Intracellular Regulation of Ion Channels*. NATO ASI Series. H60: 99-105.

Hoth M., Penner R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 355: 353-356.

Hoth M., Penner R. 1993. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J. Physiol.* 465: 359-386.

Howard T., Chaponnier C., Yin H., Stossel T. 1990. Gelsolin-actin interaction and actin polymerization in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 110: 1983-1991.

Huang X.-Y., Morielli A. D., Peralta E. G. 1993. Tyrosine kinase-dependent suppression of a potassium channel by the G-protein-coupled ml muscarinic acetylcholine receptor. *Cell*. 75: 1145-1156.

Huang Y., Putney J.W. 1998. Relationship between intracellular Ca^{2+} store depletion and Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current in a mast cell line RBL-1. *J. Biol. Chem.* 273: 19554-19559.

Huang Y., Takahashi M., Tanzawa K., Putney J.W. 1998. Effect of adenophostin A on Ca^{2+} entry and calcium release-activated calcium current (I_{crac}) in rat basophilic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 273: 31815-31821.

Huang J. M. C., Xian H., Bacaner M. 1992. Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 6452-6456.

Humes J.L., Burger S., Galavage M., Kuehl F.A., Wightman P.D., Dahlgren M.E., Davies P., Bonney R.J. 1980. The diminished production of arachidonic acid oxygenation products by elicited mouse peritoneal macrophages: possible mechanisms. *J. Immunol.* 124: 2110-2116.

Humes J.L., Sadowski S., Galavage M., Goldenberg M., Subers E., Bonney R.J., Kuehl F.A. 1982. Evidence for two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 257: 1591.

Hunter T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 80: 225-236.

Hunter T. 1996. Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Bioch. Soc. Trans.* 24: 307-327.

Huser J., Holda J.R., Kockskamper J., Blatter L.A. 1999. Focal agonist stimulation results in spatially restricted Ca^{2+} release and capacitative Ca^{2+} entry in bovine vascular endothelial cells. *J. Physiol.* 514.1: 101-109.

Hussain A., Inesi G. 1999. Involvement of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases in cell function and the cellular consequences of their inhibition. *J. Membrane Biol.* 172: 91-99.

Ihle J.N. 1996. Signaling by the cytokine receptor superfamily in normal and transformed hematopoietic cells. *Adv. Cancer Res.* 68: 23-65.

Irvine R.F. 1982. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204: 3-16.

Irvine R.F. 1990. "Quantal" Ca^{2+} -release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates – a possible mechanism. *FEBS Lett.* 263: 5-9.

Irvine R.F. 1992. Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: toward a proliferation or a simplification? *FASEB J.* 6: 3085-3091.

Islam Md.Sh., Kindmark H., Larsson O., Berggren P.-O. 1997. Thiol oxidation by 2, 2'-dithiodipyridine causes a reversible increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in pancreatic β -cells. Role for inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores. *Biochem. J.* 321: 347-354.

Ismailov I.I., Benos D.J. 1995. Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney International.* 48: 1167-1179.

Isom L.L., De Jongh K.S., Catterall W.A. 1994. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron.* 12: 1183-1194.

Iyengar R., Birnbaumer L. 1990. Roles of G-proteins and G-protein subunits in signal transduction. *Lymphokine Res.* 9: 533-537.

Jackson T.R., Patterson S.I., Thastrup O., Hanley M.R. 1988. A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca^{2+} without generation of inositol phosphates in NG 115-401 L neuronal cells. *Biochem. J.* 253: 81-86.

Jacobson P.B., Jacobs R.S. 1992 a. Fuscoside: an anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. I. Physiological and biochemical studies in murine inflammatory models. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 262: 866-873.

Jacobson P.B., Jacobs R.S. 1992 b. Fuscoside: an anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. II. Biochemical studies in the human neutrophil. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 262: 874-882.

Jaconi M.E.E., Lew D.P., Monod A., Krause K.-H. 1993. The regulation of store-dependent Ca^{2+} influx in HL-60 granulocytes involves GTP-sensitive elements. *J. Biol. Chem.* 268: 26075-26078.

Jaconi M., Pyle J., Bortolon R., Ou J., Clapham D. 1997. Calcium release and influx colocalize to the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* 7: 599-602.

James P., Inue M., Tada M., Chiesti M., Carafoli E. 1989. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca^{2+} pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature.* 342: 90-92.

Janes P.W., Ley S.C., Magee A.I. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147: 447-461.

Janmey P.A. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 169-191.

Janmey P.A. 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78: 763-781.

Jay S.D., Sharp A.H., Kahl St.D. et al. 1991. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α_2 -subunit and the associated δ peptides. *J. Biol. Chem.* 266: 3287-3293.

Jayadev S., Petranks J.G., Cheran S.K., Biermann J.A., Barrett J.C., Murthy E. 1999. Reduced capacitative calcium entry correlates with vesicle accumulation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274: 8261-8268.

Jayaraman T., Brillantes A.M., Timerman A.P., Fleischer S., Erdjumentbromage H., Tempst P., Marks A.R. 1992. FK 506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 267: 9474-9477.

Jayaraman T., Ondrias K., Ondriasova E., Marks A.R. 1996. Regulation of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science.* 272: 1492- 1494.

Jo H., Byer S., McDonald J.M. 1993. Insulin stimulates association of a 41 kDa G-protein (G_{i41}) with the insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 99-106.

Jonas E.A., Kaczmarek L.K. 1996. Regulation of potassium channels by protein kinases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 318-323.

Jones D.T., Barbosa E., Reed R.R. 1988. Olfactory signal transduction utilizes a novel GTP-binding protein. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53: 349-353.

Jones D.T., Reed R.R. 1987. Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J. Biol. Chem.* 262: 14241-14249.

Joseph S. K., Samanta S. 1993. Detergent solubility of the inositol trisphosphate receptor in rat brain membranes. Evidence for association of the receptor with ankyrin. *J. Biol. Chem.* 268: 6477-6486.

Jouaville L.S., Ichas F., Holmuhamedov E.L., Camacho P., Lechleiter J.F. 1995. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 377: 438-441.

Kaeffer V., Pfannkuche H.-J., Wessel K., Sommermeyer H., Resch K. 1990. Eicosanoid synthesis in resident macrophages: role of protein kinase C. In: *Biology of Cellular transducing signals.* N. Y. Lond.: Plenum Press, 359-369.

Kaftan E., Marks A.R., Ehrlich B.E. 1996. Effect of rapamycin on ryanodine receptor/calcium release channels from skeletal and cardiac muscle. *Circ. Res.* 78: 990-997.

Kamp T.J., Hell J.W. 2000. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ. Res.* 87: 1095-1105.

Kao J.P.Y. 1994. Practical aspects of measuring $[Ca^{2+}]_i$ with fluorescent indicators. In: *Methods in cell biology.* 40: 155-181.

Kaplin A.I., Ferris C.D., Voglmaier S.M., Snyder S.H. 1994. Purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Thiol reagents act directly on receptor protein. *J. Biol. Chem.* 269: 28972-28978.

Karschin A. 1999. G protein regulation of inwardly rectifying K⁺ channels. *News Physiol. Sci.* 14: 215-220.

Kasai H., Petersen O.H. 1994. Spatial dynamics of second messengers: IP₃ and cAMP as long-range and associative messengers. *Trends Neurosci.* 17: 95-101.

Katada T., Bokoch G.M., Smigel M.D., Ui M., Gilman A. 1984. The inhibitory guanine nucleotide-regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3586-3595.

Katada T., Oinuma M., Ui M. 1986. Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrates of islet-activating protein-pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 261: 5215-5221.

Kaupp U.B., Niidome T., Tanabe T., Terada S., Bonigk W., Stuhmer W., Cook N.J., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Miyata T., Numa S. 1989. Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature.* 342: 762-766.

Kawamoto S., Hidaka H. 1984. 1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 258-264.

Kaznacheyeva E., Zubov A., Nikolaev A., Alexeenko V., Bezprczvanny I., Mozhayeva G.N. 2000. Plasma membrane calcium channels in human carcinoma A431 cells are functionally coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate complexes. *J. Biol. Chem.* 275: 4561-4564.

Kennelly P.J., Krebs E.G. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266: 15555-15558.

Kerschbaum H.H., Cahalan M.D. 1998. Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 111: 521-537.

Kim H.Y., Thomas D., Hanley M.R. 1995. Chromatographic resolution of an intracellular calcium influx factor from thapsigargin-activated Jurkat cells. *J. Biol. Chem.* 270: 9706-9708.

Kiselyov K.I., Semyonova S.B., Mamin A.G., Mozhayeva G.N. 1997a. IP₃-activated Ca²⁺ channels in plasma membrane of mouse macrophages. In: *Materials of XXXIII International Congress of Physiological Sciences*. St. Petersburg. P002.42.

Kiselyov K.I., Mamin A.G., Semyonova S.B., Mozhayeva G.N. 1997b. Low conductance high selective inositol (1,4,5)-trisphosphate-activated Ca²⁺

channels in plasma membrane of A431 carcinoma cells. *FEBS Lett.* 407: 309-312.

Kiselyov K., Mignery G.A., Zhu M.X., Muallem S. 1999. The N-terminal domain of the IP_3 receptor gates store-operated hTrp 3 channels. *Mol. Cell.* 4: 423-429.

Kiselyov K., Xu X., Mozhayeva G., Kuo T., Pessah I., Mignery G., Zhu X., Birnbaumer L., Muallem Sh. 1998. Functional interaction between $InsP_3$ receptors and store-operated hTrp3 channels. *Nature.* 396: 478-482.

Kiss A.L., Geuze H.J. 1997. Caveolae can be alternative endocytotic structures in elicited macrophages. *Europ. J. Cell Biol.* 73: 19-27.

Klein M.G., Cheng H., Santana L.F., Jiang Y.H., Lederer W.J., Schneider M.F. 1996. Two mechanisms of quantized Ca^{2+} -release in skeletal muscle. *Nature.* 379: 455-458.

Klugbauer N., Marais E., Lacinova L., Hofmann F. 1999. A T-type calcium channel from mouse brain. *Pflügers Arch.* 437: 710-715.

Kobayashi E., Nakano H., Morimoto M., Tamaoki T. 1989. Calphostin C [UCN-1028 C], a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 548-553.

Komalavilas P., Lincoln T.N. 1994. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 8701-8707.

Komalavilas P., Lincoln T.N. 1996. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 21933-21938.

Koshihara Y., Neichi T., Murota S., Lao A., Fujimoto Y., Tatsuno T. 1984. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. acta.* 792: 92-97.

Koster J.C., Sha Q., Nichols C.G. 1999. Sulfonylurea and K^+ -channel opener sensitivity of K_{ATP} channels: functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits. *J. Gen. Physiol.* 114: 203-213.

Kozumbo W.J., Muehlemaier D., Jorg A., Emerit I., Cerutti P. 1987. Phorbol ester-induced formation of clastogenic factor from human monocytes. *Carcinogenesis.* 8: 521.

Kramer R.M., Hession C., Johansen B., Hayes G., Mc Gray P., Chow E.P., Tizard R., Pepinsky R.B. 1989. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A_2 . *J. Biol. Chem.* 264: 5768-5775.

Kramer R.M., Robert E.F., Manetta J., Putam J.E. 1991. The Ca^{2+} -sensitive cytosolic phospholipase A_2 is a 100 kDa protein in human monoblast U937 cells. *J. Biol. Chem.* 66: 5268-5272.

Kraus R.L., Hering S., Grabner M., Ostler D., Striessnig J. 1998. Molecular mechanism of diltiazem interaction with L-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 273: 27205-27212.

Kreuter M.H., Leake R.E., Rinaldi F., Mueller-Klieser W., Maidhof A., Mueller E.G., Schroeder H.C. 1990. Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aerophysinin-1. *Comp. Biochem. Physiol.* 97 B: 151-158.

Krupinski J., Coussen F., Bakalayr H.A., Tang W.-I., Feinstein P.G., Orth K., Slaughter C., Reed R.R., Gilman A.G. 1989. Adenyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science*. 244: 1558-1564.

Kruse H.J., Negrescu E.V., Weber P.C., Siess W. 1994. Thrombin-induced Ca^{2+} influx and protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells is inhibited by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1651-1656.

Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Roschina N.G. 1994. The delayed-rectifying K^{+} -channels in mouse peritoneal macrophages: pharmacological analysis. In: Materials of the International workshop "Mechanisms of Ca^{2+} homeostasis in excitable cells". Kiev, April 1993. *Нейрофизиология. Neurophysiology*. 26 (1): 49-53.

Kuiper J., Kamps J.A.A.M., Van Berkel T.J.C. 1989. Induction of ornithine decarboxylase in rat liver by phorbol ester is mediated by prostanoids from Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* 264: 6874.

Kusaka M., Sperelakis N. 1996. Genistein inhibition of fast Na^{+} current in uterine leiomyosarcoma cells is independent of tyrosine kinase inhibition. *Biochim. biophys. acta*. 1278: 1-4.

Kuo J.F., Greengard P. 1970. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by cGMP. *J. Biol. Chem.* 245: 2493-2498.

Lacinova L., Schuster A., Klugbauer N., Hofmann F. 1996. The IV S6 segment of the L-type Ca channel participates in high affinity interaction with organic Ca blockers. *Progr. Bioph. Mol. Biol.* 65: 106.

Lai F.A., Erickson P., Rousseau E., Liu Q.-I., Meissner G. 1988. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*. 331: 315-319.

Lapetina E.C. 1990. Eicosanoid formation and regulation of phospholipase A_2 . Biology of cellular transducing signals. New York; London: Plenum Press: 275-280.

Lau A.F., Kurata W.E., Kanemitsu M.Y., Loo L.W.M., Warn-Cramer B.J., Eckhart W., Lampe P.D. 1996. Regulation of connexin 43 function by activated tyrosine protein kinases. *J. Bioenergetics and Biomembranes*. 28: 359-368.

Laviolette M., Carreau M., Coulombe R. 1988. Metabolism of arachidonic acid through the 5-lipoxygenase pathway in normal human peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 141: 2104-2109.

Lawrie A.M., Rizzuto R., Pozzan T., Simpson A.W.M. 1996. A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 10753-10759.

Lee S.-R., Kwon K.-S., Kim S.-R., Rhee S.G. 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273: 15366-15372.

Lee S.B., Rhee S. G. 1995. Significance of PIP_2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Current Opin. Cell Biol.* 7: 183-189.

Lee K.M., Toscas K., Villereal M.L. 1993. Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced Ca^{2+} entry by tyrosine kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 268: 9945-9948.

Le Deist F., Hivroz C., Partiseti M., Thomas C., Buc H.A., Oleastro M., Belohradsky B., Choquet D., Fischer A. 1995. A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood.* 85: 1053-1062.

Leong P., Mac Lennan D.H. 1998. The cytoplasmic loops between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 29958-29964.

Lepple-Wienhues A., Cahalan M.D. 1996. Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca^{2+} channels (I_{crac}) in Jurkat T cells. *Biophys. J.* 71: 787-794.

Leslie C.C., Voelker D.R., Channon J.Y., Wall M.M., Zelarney P.T. 1988. Properties and purification of an arachidonyl-hydrolyzing phospholipase A_2 from a macrophage line, RAW 264.7. *Biochim. biophys. acta.* 963: 476-492.

Levine B.A., Clark B., Ellis L. 1991. A soluble insulin receptor kinase catalyzes ordered phosphorylation at multiple tyrosines of dodecapeptide substrates. *J. Biol. Chem.* 266: 3565-3570.

Levitan I.B. 1985. Phosphorylation of ion channels. *J. Membr. Biol.* 1985. 87: 177-190.

Levitan I.B. 1988. Modulation of ion channels in neurons and other cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 11: 119-136.

Levitan I.B. 1994. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 193-212.

Levitzki A. 1992. Tyrphostins: tyrosine kinase blockers as novel antiproliferative agents and dissectors of signal transduction. *FASEB J.* 6: 3275-3282.

Levitzki A., Gazit A. 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 267: 1782-1788.

Levitzki A., Gilon C. 1991. Tyrphostins as molecular tools and potential antiproliferative drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 171-174.

Lewis R.S., Cahalan M.D. 1995. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 623-653.

Li S., Couet J., Lisanti M.P. 1996. Src tyrosine kinases, G α subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin: caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 29182-29190.

Li S., Okamoto T., Chun M., Sargiacomo M., Casanova J.E., Hansen S.H., Nishimoto I., Lisanti M.P. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G-proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270: 15693-15701.

Liao K., Hoffman R.D., Lane M.D. 1991. Phosphotyrosyl turnover in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 266: 6544-6554.

Lievremont J.-Ph., Hill A.-M., Hilly M., Mauger J.-P. 1994. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is localized on specialized sub-regions of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem. J.* 300: 419-427.

Lin L.L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A., Davis R.J. 1993. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72: 269-278.

Lincoln Th. M., Cornwell T. L. 1993. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7: 328-338.

Lindsay A.R.G., Tinker A., Willams A.J. 1994. How does ryanodine modify ion handling in the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel? *J. Gen. Physiol.* 104: 425-447.

Lisanti M.P., Scherer P. E., Vidugiriene J., Tang Z., Hermanowski-Vosatka A., Tu Y.-H., Cook R.F., Sargiacomo M. 1994. Characterization of caveolin rich membrane domains from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* 126: 111-126.

Liscovitch M., Cantley L.C. 1994. Lipid second messengers. *Cell* 77: 329-334.

Lister M.D., Glaser K.B., Ulevitch R.G., Dennis E.A. 1989. Inhibition studies on the membrane-associated phospholipase A₂ in vitro and prostaglandin E₂ production in vivo of the macrophage like P388 D1 cells: effects of manoalide, 7,7-dimethyl-5,8-eicosadienoic acid and p-bromophenacyl bromide. *J. Biol. Chem.* 264: 8520-8528.

Liu Y., Ruoho A.E., Rao V.D., Hurley J.H. 1997. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13414-13419.

Lockwich T., Liu X., Singh B.B., Jadowiec J., Weiland S., Ambudkar I. 2000. Assembly of trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J. Biol. Chem.* 275: 11934-11942.

Lockwich T., Singh B.B., Liu X., Ambudkar I.S. 2001. Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp 3)-associated caveolar Ca²⁺ signaling complex and loss of Ca²⁺ influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J. Biol. Chem.* 276: 42401-42408.

Logothetis D.E., Zhang H. 1999. Gating of G protein-sensitive inwardly rectifying K⁺ channels through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Physiol.* 520.3: 630.

Louzao M.C., Ribeiro C.M.P., Bird G.S.J., Putney J.W. 1996. Cell type-specific modes of feedback regulation of capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.* 271: 14807-14813.

Lu Z., Ding L. 1999. Blockade of a retinal cGMP-gated channel by polyamines. *J. Gen. Physiol.* 113: 35-43.

Luna E.J., Hitt A.L. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science.* 258: 955-964.

Lupu V.D., Kaznacheyeva E., Krishna U.M., Falck J.R., Bezprozvanny I. 1998. Functional coupling of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 14067-14070.

Ma H.-T., Patterson R.L., van Rossum D.B., Birnbaumer L., Mikoshiba K., Gill D.L. 2000. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science.* 287: 1647-1651.

Mac Lennan D.H., Rice W.J., Green N.M. 1997. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* 272: 28815-28818.

MacMicking J., Xie Q.-W., Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.

Maeda N., Kawasaki T., Nakade S., Yokota N., Taguchi T., Kasai M., Mikoshiba K. 1991. Structural and functional characterization of IP₃ receptor channel from mouse cerebellum. *J. Biol. Chem.* 266: 1109-1116.

Mahaut-Smith M.P., Sage St.O., Rink T.J. 1990. Receptor-activated single channels in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 265: 10479-10483.

Mak D.O., Foskett J.K. 1994. Single-channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor currents revealed by patch clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Biol. Chem.* 269: 29375-29378.

Malarkey K., Belham Ch.M., Paul A., Graham A., McLees A., Scott P.H., Plevin R. 1995. The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 309: 361-375.

Male E., Leis H.J., Karadi I., Kostner G.M. 1987. Lipoxygenases and hydroperoxy / hydroxyeicosatetraenoic acid formation. *Int. J. Biochem.* 19: 1013-1022.

Marks A.R. 1997. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Amer. J. Physiol.* 272: H597- H605.

Marshall C.J. 1995. Specificity of Receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80: 179-185.

Marshall I.C.B., Taylor C.W. 1993. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Exp. Biol.* 184: 161-182.

Martens J.R., Navarro-Polanco R., Coppock E.A., Nishiyama A., Parshley L., Grobaski T.D., Tamkun M.M. 2000. Differential targeting of shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 7443-7446.

Martin T.F.J. 1998. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 231-264.

Maruyama Y. 1990. Inhibitory effects of arachidonic acid on muscarinic current response in single pancreatic acinar cells of rats. *J. Physiol.* 430: 471-482.

Maruyama Y. 1993. Control of inositol polyphosphate-mediated Ca mobilization by arachidonic acid in pancreatic acinar cells of rats. *J. Physiol.* 463: 729-746.

Mason M.J., Garcia-Rodriguez C., Grinstein S. 1991. Coupling between intracellular Ca^{2+} stores and the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 20856-20862.

Mason M.J., Mayer B., Hymel L.J. 1993. Inhibition of Ca^{2+} transport pathways in thymic lymphocytes by econazole, miconazole, and SKF 96365. *Amer. J. Physiol.* 264: C654-C662.

Masters S.B., Stroud R.M., Bourne H. 1986. Family of G protein α -chains: amphipathic analysis and predicted structure of functional domains. *Prot. Eng.* 1: 47-54.

Matsumoto P.S., Ohara A., Duchatelle P., Eaton D.C. 1993. Tyrosine kinase regulates epithelial sodium transport in A6 cells. *Amer. J. Physiol.* 264: C246-C250.

Matsuoka M., Itoh H., Kozasa T., Kaziro Y. 1988. Sequence analysis of cDNA and genomic DNA for a putative pertussis toxin insensitive guanine nucleotide binding regulatory protein α subunit. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85: 5384-5388.

Matter N., Ritz M.-F., Freyermuth S., Rogue P., Malviya A.N. 1993. Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 268: 732-736.

Mattera R., Codina J., Crozat A., Kidd V., Woo S.L.C., Birnbaumer L. 1986. Identification by molecular cloning of two forms of the α subunit of the human liver stimulatory (Gs) regulatory component of adenyl cyclase. *FEBS Lett.* 206: 36-42.

Mattie M., Brooker G., Spiegel S. 1994. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 3181-3188.

Mayer R.J., Marshall L.A. 1993. New insights on mammalian phospholipase A₂ (s): comparison of arachidonyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J.* 7: 339-348.

McCarron J.G., Muir Th.C. 1999. Mitochondrial regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration and InsP₃-sensitive Ca²⁺ store in guinea-pig colonic smooth muscle. *J. Physiol.* 516.1: 149-161.

McCleskey E.W., Womack M.D., Fieber L. 1993. Structural properties of voltage-dependent calcium channels. *Int. Rev. Cytology.* 137 C: 39-53.

McPhail L.C., Clayton C.C., Snyderman R. 1984. A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca²⁺-dependent protein kinase. *Science.* 224: 622-624.

Medema R.H., Burgering B.M.T., Bes J.L. 1991. Insulin-induced p 21 ras activation does not require protein kinase C, but a protein sensitive to phenylarsine oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 21186-21189.

Meissner G. 1994. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 485-508.

Meldolesi J., Pozzan T. 1987. Pathways of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Exp. Cell Res.* 171: 271-283.

Meldolesi J., Pozzan T. 1998. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* 23: 10-14.

Melkonian K.A., Ostermeyer A.G., Chen J.Z., Roth M.G., Brown D.A. 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 274: 3910-3917.

Mery L., Mesaeli N., Michalak M., Opas M., Lew D.P., Krause K.-H. 1996. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *J. Biol. Chem.* 271: 9332-9339.

Meves H. 1994. Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Progr. Neurobiol.* 43: 175-186.

Mignery G.A., Sudhof T.C. 1990. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *EMBO J.* 9: 3893-3898.

Mignery G.A., Newton C.L., Archer B.T., Sudhof T.C. 1990. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 265: 12679-12685.

Mikala G., Bahinski A., Yatani A., Tang S., Schwartz A. 1993. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca²⁺ channel pore. *FEBS Lett.* 335: 265-269.

Milligan G., Mullaney I., Unson C., Marshall L., Spiegel A.M., McArdle H. 1988. GTP analogues promote release of the α subunit of the guanine nucleotide binding protein, G_{i2} from membranes of rat glioma C6 BU1 cells. *Biochem. J.* 254: 391-396.

Minke B., Cook B. 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.* 82: 429-472.

Mire-Sluis A.R., Cox C.A., Hoffbrand A.V., Wickremasinha R.G. 1989. Inhibitors of arachidonic acid lipoxygenase impair the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by the T lymphocyte mitogen phytohemagglutinin. *FEBS Lett.* 258: 84-88.

Missiaen L., De Smedt H., Droogmans G., Casteels R. 1992a. Ca^{2+} release induced by inositol-1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca^{2+} in permeabilized cells. *Nature.* 357: 599-602.

Missiaen L., Taylor C.W., Berridge M.J. 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature.* 352: 241-244.

Missiaen L., Taylor C.W., Berridge M.J. 1992b. Luminal $[\text{Ca}^{2+}]$ promoting spontaneous Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} stores in rat hepatocytes. *J. Physiol.* 455: 623-640.

Mitterdorfer J., Wang Zh., Sinnegger M.J., Hering St., Striessnig J., Grabner M., Glossmann H. 1996. Two amino acid residues in the IIS5 segment of L-type calcium channels differentially contribute to 1,4-dihydropyridine sensitivity. *J. Biol. Chem.* 271: 30330-30335.

Mochly-Rosen D. 1995. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* 268: 247-251.

Mochly-Rosen D., Khaner H., Lopez J. 1991. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3997-4000.

Moffett S., Brown D.A., Linder M.E. 2000. Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 2191-2198.

Mogami H., Tepikin A.V., Petersen O.H. 1998. Termination of cytosolic Ca^{2+} signals: Ca^{2+} reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca^{2+} concentration in the store lumen. *EMBO J.* 17: 435-442.

Molokanova E., Trivedi B., Savchenko A., Kramer R.H. 1997. Modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels by tyrosine phosphorylation. *J. Neuroscience.* 17: 9068-9076.

Molokanova E., Savchenko A., Kramer R.H. 1999. Noncatalytic inhibition of cyclic nucleotide-gated channels by tyrosine kinase induced by genistein. *J. Gen. Physiol.* 113: 45-56.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.

Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V., Bindels R.J et al. 2002. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell.* 9: 229-231.

Montero M., Alvarez J., Garcia-Sancho J. 1991. Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular Ca^{2+} stores. *Biochem. J.* 277: 73-79.

Montero M., Brini M., Marsault R., Alvarez J., Sitia R., Pozzan T., Rizzuto R. 1995. Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J.* 14: 5467-5475.

Mori Y., Mikala G., Varadi G., Kobayashi T., Koch Sh., Wakamori M., Schwartz A. 1996. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jap. J. Pharmacol.* 72: 83-109.

Moriarty T.M., Padrell E., Corby D.J., Omri G., Landau E.M., Iyengar R. 1990. G_0 as the signal transducer in the Pertussis Toxin Sensitive Phosphatidylinositol pathway. *Nature.* 343: 79-82.

Morris A.J., Waldo G.L., Boyer J.L., Hepler J.R., Downes C.P., Harden T.K. 1990. Regulation of phospholipase C. In: G proteins and signal transduction. Rockefeller University Press, 62-75.

Motoike H.K., Bodi I., Nakayama H., Schwartz A., Varadi G. 1999. A region in IVS5 of the human cardiac L-type calcium channel is required for the use-dependent block by phenylalkylamines and benzothiazepines. *J. Biol. Chem.* 274: 9409-9420.

Mousli M., Bueb J.-L., Bronner Ch, Rouot B., Landry Y. 1990. G-protein activation: a new receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *TIPS.* 11: 358-362.

Mozhayeva G.N., Naumov A.P., Kuryshev Y.A. 1991. Variety of Ca^{2+} -permeable channels in human carcinoma A431 cells. *J. Membr. Biol.* 124: 113-126.

Murphy S., Welk G. 1989. Arachidonic acid evokes inositol phospholipid hydrolysis in astrocytes. *FEBS Lett.* 257: 68-70.

Nakai J., Dirksen R.T., Nguyen H.T., Pessah I.N., Beam K.G., Allen P.D. 1996. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature.* 380: 72-75.

Nakai J., Sekiguchi N., Rando T.A., Allen P.D., Beam K.G. 1998. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 273: 13403-13406.

Narasimhan V., Holowka D., Baird B. 1990. A guanine nucleotide-binding protein participates in IgE receptor-mediated activation of endogenous and reconstituted phospholipase A_2 in a permeabilized cell system. *J. Biol. Chem.* 264: 1459-1464.

Naumov A.P., Kaznacheyeva E.V., Kiselyov K.I., Kuryshev Y.A., Mamin A.G., Mozhayeva G.N. 1995a. ATP-activated inward current and calcium-permeable channels in rat macrophages plasma membranes. *J. Physiol.* 486.2: 323-337.

Naumov A.P., Kaznacheyeva E.V., Kuryshev Y.A., Mozhayeva G.N. 1995b. Selectivity of ATP-activated GTP-dependent Ca^{2+} -permeable channels in rat macrophage plasma membrane. *J. Membr. Biol.* 148: 91-98.

Naumov A.P., Kiselyov K.I., Mamin A.G., Kaznacheyeva E.V., Kuryshev Yu.A., Mozhayeva G.N. 1995c. ATP-operated calcium permeable

channels activated via a guanine nucleotide-dependent mechanism in rat macrophages. *J. Physiol.* 486.2: 339-347.

Naumov A.P., Kuryshev Y.A., Kaznacheyeva E.V., Mozhayeva G.N. 1992. ATP-activated Ca^{2+} -permeable channels in rat peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 313: 285-287.

Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 69-102.

Neer E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.* 80: 249-257.

Neer E.J., Clapham D.E. 1988. Roles of G protein subunits in transmembrane signaling. *Nature.* 333: 129-134.

Neer E.J., Wolf L.G., Gill D.M. 1987. The stimulatory guanine nucleotide regulatory unit of adenylate cyclase from bovine cerebral cortex. *Biochem. J.* 241: 325-336.

Nemenoff R.A., Winitz S., Qian N., van Putten V., Johnson G.L., Heasley L.E. 1993. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A_2 by p 42 microtubule - associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268: 1960-1964.

Neubig R.R. 1994. Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* 8: 939-946.

Nishizuka Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature.* 308: 693-698.

Nishizuka Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 233: 305.

Nishizuka Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 334: 661-665.

Nishizuka Y. 1992. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258: 607-614.

Nishizuka Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9: 484-496.

Northup J.K., Sternweis P.C., Gilman A.G. 1983a. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution, activity and properties of 35000-dalton (beta) subunit. *J. Biol. Chem.* 258: 11361-11368.

Northup J.K., Smigel M.D., Sternweis P.C., Gilman A.G. 1983b. The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45000-dalton (alpha) subunit. *J. Biol. Chem.* 258: 11369-11376.

Norwood N., Moore T., Dean D., Bhattacharjee R., Li M., Stevens T. 2000. Store-operated calcium entry and increased endothelial cell permeability. *Am. J. Physiol.* 279: L815-L824.

Nozawa Y., Nakashima Sh., Nagata K. 1991. Phospholipid-mediated signaling in receptor activation of human platelets. *Biochim. biophys. acta.* 1082: 219-238.

Nukada T., Tanabe T., Takahashi H., Noda M., Haga K., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Hiranaga M., Matsuo H., Numa S. 1986a. Primary structure of the alpha-subunit of bovine adenylate cyclase inhibiting G-protein deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* 197: 305-310.

Nukada T., Tanabe T., Takahashi H., Noda M., Hirose T., Inayama S., Numa S. 1986b. Primary structure of the alpha-subunit of bovine adenylate cyclase-stimulating G-protein deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* 1986b. 195: 220-224.

Oka N., Yamamoto M., Schwencke C., Kawabe J., Ebina T., Ohno S., Couet J., Lisanti M.P., Ishikawa Y. 1997. Caveolin interaction with protein kinase C: isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J. Biol. Chem.* 272: 33416-33421.

Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E., Lisanti M.P. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 5419-5422.

Onoda T., Inuma H., Sazaki Y., Hamada M., Isshiki K., Naganawa H., Takeuchi T. 1989. Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A, from *Streptomyces griseolavendus*. *J. Natural Products.* 52: 1252-1257.

Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V. 1991. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.* 14: 96-100.

Otsu K., Willard H.F., Khanna V.K., Zorzato F., Green N.M., Mac Lennan D.H. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265: 13472-13483.

Pandolf St.J., Schoeffield-Payne M.S. 1990. Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell. *J. Biol. Chem.* 265: 12846-12853.

Parekh A.B. 1998. Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *J. Biol. Chem.* 273: 14925-14932.

Parekh A.B., Fleig A., Penner R. 1997. The store-operated calcium current I_{crac} : nonlinear activation by InsP_3 and dissociation from calcium release. *Cell.* 89: 973-980.

Parekh A.B., Penner R. 1995. Activation of store-operated calcium influx at resting InsP_3 levels by sensitization of the InsP_3 receptor in rat basophylic leukaemia cells. *J. Physiol.* 489.2: 377-382.

Parekh A.B., Penner R. 1996. Regulation of store-operated calcium currents in mast cells. In: *Organelle Ion Channels and Transporters*. Rockefeller University Press. Society of Gen. Physiol. Ser. 51: 231-239.

Parekh A.B., Penner R. 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77: 901-930.

Parekh A.B., Terlau H., Stuhmer W. 1993. Depletion of InsP_3 stores activates a Ca^{2+} and K^{+} current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature.* 364: 814-818.

- Park Y.B., Herrington J., Babcock D.F., Hille B. 1996. Ca^{2+} clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.* 492: 329-346.
- Partiseti M., Le Deist F., Hivroz C., Fischer A., Korn H., Choquet D. 1994. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J. Biol. Chem.* 269: 32327-32335.
- Parys J.B., Bezprozvanny I. 1995. The inositol trisphosphate receptor of *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium*. 19: 353-363.
- Patterson R.L., Van Rossum D.B., Gill D.L. 1999. Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell*. 98: 487-499.
- Pawson T. 1994. SH2 and SH3 domains in signal transduction. *Adv. Cancer. Res.* 64: 87-110.
- Pawson T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373: 573-580.
- Peng J.-B., Chen X.-Z., Berger U.V., Vassilev P.M., Tsukaguchi H., Brown E.M., Hediger M.A. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* 274: 22739-22746.
- Peppelenbosch M.P., Tertoolen L.G.J., den Hertog J., de Laat S.W. 1992. Epidermal growth factor activates calcium channels by phospholipase $\text{A}_2/5$ -lipoxygenase-mediated leukotriene C_4 production. *Cell*. 1992. 69: 295-303.
- Peralta E.G. 1995. Dual modulation of a potassium channel by the m1 muscarinic and β_2 -adrenergic receptors. *Life Sci.* 56: 957-964.
- Perez-Reyes E., Cribbs L.L., Daud A., Lacerda A.E., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., Lee J.-H. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*. 391: 896-900.
- Petersen O.H. 1996. New aspects of cytosolic calcium signaling. *News Physiol. Sci.* 11: 13-17.
- Petersen C.C.H., Berridge M.J. 1995. G-protein regulation of capacitative calcium entry may be mediated by protein kinases A and C in *Xenopus* oocytes. *Biochem. J.* 307: 663-668.
- Petersen C.C.H., Berridge M.J. 1996. Capacitative calcium entry is colocalised with calcium release in *Xenopus* oocytes: evidence against a highly diffusible calcium influx factor. *Pflügers Arch.* 432: 286-292.
- Petersen C.C.H., Berridge M.J., Borge M.F., Bennett D.L. 1995. Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem. J.* 311: 41-44.
- Peters-Golden M., Mc Nish R.W., Brieland J.K., Fantone J.C. 1990. Diminished protein kinase C-activated arachidonate metabolism accompanies rat macrophage differentiation in the lung. *J. Immunol.* 144: 4320-4326.

Peterson B.Z., Tanada T.N., Catterall W.A. 1996. Molecular determinants of high affinity dihydropyridine binding in L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 271: 5293-5296.

Petit-Jacques J., Liang Sui J., Logothetis D.E. 1999. Synergistic activation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the $\beta\gamma$ subunits of G proteins and Na^+ and Mg^{2+} ions. *J. Gen. Physiol.* 114: 673-684.

Pettit E.J., Fay F.S. 1998. Cytosolic free calcium and cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol. Rev.* 78: 949-967.

Pettit E.J., Hallett M.B. 1996. Temporal and spatial resolution of Ca^{2+} release and influx in human neutrophils using a novel confocal laser scanning mode. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 109-113.

Pfannkuche H.J., Kaefer V., Gerns D., Resch K. 1989. Regulation of prostaglandin synthesis by protein kinase C in mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J.* 260: 471.

Pfeiffer F., Schmid A., Schulz I. 1995. Capacitative Ca^{2+} influx and a Ca^{2+} -dependent nonselective cation pathway are discriminated by genistein in mouse pancreatic acinar cells. *Eur. J. Physiol.* 430: 916-922.

Philipp S., Cavalie A., Freichel M., Wissenbach U., Zimmer S., Trost C., Marguaret A., Murakami M., Flockerzi V. 1996. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J.* 15: 6166-6171.

Phillips A.M., Bull A., Kelly L.E. 1992. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron.* 8: 631-642.

Pickard R.T., Chiou X.G., Striffler B.A., De Felippis M.R., Hyslop P.A., Tebbe A.L., Yee Y.K., Reynolds L.J., Dennis E.A., Kramer R.M., Sharp J.D. 1996. Identification of essential residues for the catalytic function of 85 kDa cytosolic phospholipase A_2 . Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine and arginine. *J. Biol. Chem.* 271: 19225-19231.

Pietrobon D., Di Virgilio F., Pozzan T. 1990. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 193: 599-622.

Pinton P., Pozzan T., Rizzuto R. 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 17: 5298-5308.

Piomelli F., Greengard P. 1990. Lipooxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends Pharm. Sci.* 11: 367-373.

Posner B.I., Faure R., Burgess J.W., Bevan A.P., Lachance D., Zhang-Sun G., Fantus I.G., Ng J.B., Hall D.A., Lum B.S. 1994. Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J. Biol. Chem.* 269: 4596-4604.

- Pot D.A., Woodford T.A., Remboutsika E., Haun R.S., Dixon J. E. 1991. Cloning, bacterial expression, purification and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* 266: 19688-19696.
- Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74: 595-636.
- Pragnell M., De Waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P., Campbell K.P. 1994. Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature.* 368: 67-70.
- Prevarskaya N.B., Skryma R.N., Vacher P., Daniel N., Djiane J., Dufy B. 1995. Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and Jak2 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 24292-24299.
- Pugazhenth S., Tanha F., Dahl B., Khandelwal R. L. 1996. Inhibition of a src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase by vanadate in the primary culture of hepatocytes. *Archives Bioch. Bioph.* 335: 273-282.
- Putney J.W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* 7: 1-13.
- Putney J.W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11: 611-624.
- Putney J.W. 1997. Capacitative calcium entry. Landes Biomedical Publishing, Austin, TX. 210 P.
- Putney J.W. 1999a. "Kissin' cousins": intimate plasma membrane - ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell.* 99: 5-8.
- Putney J.W. 1999b. TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14669-14671.
- Putney J.W. 2001. Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol. Interventions.* 1: 84-94.
- Putney J.W., Bird G.S.J. 1993. The signal for capacitative calcium entry. *Cell.* 75: 199-201.
- Putney J.W., Broad L.M., Braun F.-J., Lievremon J.-P., Bird G. St. J. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell. Sci.* 114: 2223-2229.
- Putney J.W., McKay R.R. 1999. Capacitative calcium entry channels. *BioEssays.* 21.1: 38-46.
- Pyne N.J., Murphy G.J., Milligan G., Houslay M.D. 1989. Treatment of intact hepatocytes with either the phorbol ester TPA or glucagon elicits the phosphorylation and functional inactivation of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi. *FEBS Lett.* 243: 77-82.
- Ramanadham S., Gross R., Turk J. 1992. Arachidonic acid induces an increase in the cytosolic calcium concentration in single pancreatic islet beta cells. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 184: 647-653.

Ramos-Franco J., Galvan D., Mignery G.A., Fill M. 1999. Location of the permeation pathway in the recombinant type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Gen. Physiol.* 114: 243-250.

Rana R.S., Hokin L.E. 1990. Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 70: 115-163.

Randall A.D. 1998. The molecular basis of voltage-gated Ca^{2+} channel diversity: is it time for T? *J. Membrane Biol.* 161: 207-213.

Randriamampita C., Tsien R.Y. 1993. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature.* 364: 809-814.

Randriamampita C., Tsien R.Y. 1995. Degradation of a calcium influx factor (CIF) can be blocked by phosphatase inhibitors or chelation of Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 270: 29-32.

Razani B., Rubin C.S., Lisanti M.P. 1999. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 274: 26353-26360.

Reddy S., Bose R., Rao G.H., Murthy M. 1995. Phospholipase A_2 activation in human neutrophils requires influx of extracellular Ca^{2+} and leukotriene B_4 . *Amer. J. Physiol.* 268: C 138-C 146.

Resh M.D. 1994. Myristylation and palmitoylation of src family members: the fats of the matter. *Cell.* 76: 411-413.

Reynolds L., Hughes L., Louis A.I., Kramer R.A., Dennis E.A. 1993. Metal ion and salt effects on the phospholipase A_2 , lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A_2 . *Biochim. biophys. acta.* 1167: 272-280.

Rhee S.G. 1991. Inositol phospholipid specific phospholipase C: interaction of the $\gamma 1$ isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem. Sci.* 16: 297-300.

Rhee S.G., Choi K.D. 1992. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 12393-12396.

Rhee S.G., Suh P.G., Rye S.H., Lee S.Y. 1989. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science.* 244: 546-550.

Ricken S., Leipziger J., Greger R., Nitschke R. 1998. Simultaneous measurements of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} transients in HT₂₉ cells. *J. Biol. Chem.* 273: 34961-34969.

Rietveld A., Simons K. 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. biophys. acta.* 1376: 467-479.

Ringer S. 1883. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4: 29-42.

Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.-L., Drumm M.L.,

Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.-C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245: 1066-1073.

Rizzuto R., Bastianutto C., Brini M., Murgia M., Pozzan T. 1994. Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis in intact cells. *J. Cell. Biol.* 126: 1183-1194.

Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. 1993. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighbouring mitochondria. *Science*. 262: 744-747.

Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*. 280: 1763-1766.

Robb-Gaspers L.D., Burnett P., Rutter G.A., Denton R.M., Rizzuto R., Thomas A.P. 1998. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *EMBO J.* 17: 4987-5000.

Roberts M., Deems R.A., Mincey T.C., Dennis E.A. 1977. Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A_2 (*Naja naja naja*): a case of half-site reactivity. *J. Biol. Chem.* 252: 2405-2411.

Rohacs T., Chen J., Prestwich G.D., Logothetis D.E. 1999. Distinct specificities of inwardly rectifying K^+ channels for phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 274: 36065-36072.

Ron D., Chen C-H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E., Rosen D.-M. 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the β subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 839-843.

Rosado J.A., Jenner S., Sage St.O. 2000. A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. *J. Biol. Chem.* 275: 7527-7533.

Rosado J.A., Sage St. O. 2000 a. The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. *J. Physiol.* 526.2: 221-229.

Rosado J.A., Sage St.O. 2000 b. Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton. *Biochem. J.* 347: 183-192.

Rosado J.A., Sage St.O. 2000 c. Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca^{2+} stores are depleted. *Biochem. J.* 350: 631-635.

Rossier M. F., Bird G. S., Putney J. W. 1991. Subcellular distribution of the calcium-storing inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive organelle in rat liver. Possible linkage to the plasma membrane through the actin microfilaments. *Biochem. J.* 274: 643-650.

Rothberg K., Heuser J.E., Donzell W.C., Sing Y.-S., Glenney J.R., Anderson R.G.W. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coat. *Cell*. 68: 673-682.

Rouzaire-Dubois B., Gerard V., Dubois J.-M. 1991. Modification of K^+ channel properties induced by fatty acids in neuroblastoma cells. *Pflugers Arch.* 419: 467-471.

Ruknudin A., Song M.J., Sachs F. 1991. The ultrastructure of patch-clamped membranes: a study using high voltage electron microscopy. *J. Cell Biol.* 112: 125-134.

Rutter G.A., Theler J.-M., Murgia M., Wolheim C.B., Pozzan T., Rizzuto R. 1993. Increased Ca^{2+} influx raises mitochondrial free Ca^{2+} to micromolecular levels in a pancreatic beta-cell line. *J. Biol. Chem.* 268: 22385-22390.

Rybin V.O., Xu X., Steinberg S.F. 1999. Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae: stimulation of local protein phosphorylation. *Circulation Res.* 84: 980-988.

Rzagalinski B.A., Blackmore P.F., Rosenthal M.D. 1996. Arachidonate mobilization is coupled to depletion of intracellular calcium stores and influx of extracellular calcium in differentiated U937 cells. *Biochim. biophys. acta.* 1299: 342-352.

Rzagalinski B.A., Willoughby K.A., Hoffman S.W., Falck J.R., Ellis E.F. 1999. Calcium influx factor, further evidence it is 5,6-epoxyeicosatrienoic acid. *J. Biol. Chem.* 274: 175-182.

Sabbadini R.A., Betto R., Teresi A., Fachechi-Cassano G., Salviati G. 1992. The effects of sphingosine on sarcoplasmic reticulum membrane calcium release. *J. Biol. Chem.* 267: 15475-15484.

Sage St.O., Sargeant P., Jenner S., Farndale R.W. 1994. Tyrosine phosphorylation and Ca^{2+} influx. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 282.

Saltiel A.R. 1996. Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Amer. J. Physiol.* 270: E375-E385.

Santella L. 1996. The cell nucleus: an eldorado to future calcium research? *J. Membrane Biol.* 153: 83-92.

Sargeant P., Clarkson W.D., Sage St.O., Heemskerk J.W.M. 1992. Calcium influx evoked by Ca^{2+} store depletion in human platelets is more susceptible to cytochrome P-450 inhibitors than receptor mediated calcium entry. *Cell Calcium.* 13: 553-564.

Sargeant P., Farndale R.W., Sage St.O. 1993a. The tyrosine kinase inhibitors methyl 2,5 dihydroxycinnamate and genistein reduce thrombin-evoked tyrosine phosphorylation and Ca^{2+} entry in human platelets. *FEBS Lett.* 315: 242-246.

Sargeant P., Farndale R.W., Sage St.O. 1993b. ADP and thapsigargin-evoked Ca^{2+} entry and protein tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5 dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.* 268: 18151-18156.

Schlessinger J. 1994. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 25-30.

Schlessinger J., Ullrich A. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 9: 383-391.

Schmidt H. H. W., Lohmann S. M., Walter U. 1993. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim. biophys. acta*. 1178: 153-175.

Schoen H.F., Erlj D. 1987. Insulin action on electrophysiological properties of apical and basolateral membranes of frog skin. *Amer. J. Physiol.* 252: C411-C417.

Scott W.A., Pawlowski N.A., Murry H.W., Andreach M., Zrike J., Cohn Z.A. 1982. The regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J. Exp. Med.* 155: 1148-1161.

Scott W.A., Zrike J.M., Hamill A.L., Kempe J., Cohn Z.A. 1980. Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages. *J. Exp. Med.* 152: 324-335.

Segal S.S., Brett S.E., Sessa W.C. 1999. Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am. J. Physiol.* 277: 1167-1177.

Sekiya K., Okuda H. 1982. Selective inhibition of platelet lipooxygenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 1090-1095.

Sharma N.R., Davis M.J. 1996. Calcium entry activated by store depletion in coronary endothelium is promoted by tyrosine phosphorylation. *Amer. J. Physiol.* 270: H267-H274.

Sharp J.D., Pickard R.T., Chiou X.G., Manetta J.V., Kovacevic St., Miller J.R., Varshavsky A.D., Roberts E.F., Striffler B.A., Brems D.N., Kramer R.M. 1994. Serine 228 is essential for catalytic activities of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269: 23250-23254.

Sharp J.D., White D.L., Chiou X.G., Goodson T., Gamboa G.C., McClure D., Burgett S., Hoskins J., Skatrud P.L., Sportsman R.J., Roberts E.F., Kramer R.M. 1991. Molecular cloning and expression of human Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 266: 14850-14853.

Shearman M.S., Sekiguchi K., Nishizuki Y. 1989. Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmacol. Rev.* 1989. 41: 211-237.

Shen Y.-M. A., Chertihin O.I., Biltonen R.L., Sando J.J. 1999. Lipid-dependent activation of protein kinase C- α by normal alcohols. *J. Biol. Chem.* 274: 34036-34044.

Shibata Y., Abiko Y., Takiguchi H. 1988. Phospholipase A₂ in macrophage plasma membrane releases arachidonic acid from phosphatidylinositol. *Biochim. biophys. acta*. 971: 121-126.

Shibata K., Morita K., Kitayama S., Okamoto H., Dohi T. 1996. Ca²⁺ entry induced by calcium influx factor and its regulation by protein kinase C in rabbit neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 52: 167-171.

Shuttleworth T.J. 1992. Ca^{2+} release from inositol trisphosphate-sensitive stores is not modulated by intraluminal $[\text{Ca}^{2+}]$. *J. Biol. Chem.* 267: 3573-3576.

Siegelbaum S.A. 1994. Ion channel control by tyrosine phosphorylation. *Current Biol.* 4: 242-245.

Sielhamer J.J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J.A., Kloss J., Johnson L.K. 1989. Cloning and recombinant expression of phospholipase A_2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 254: 5335-5338.

Siess W. 1989. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.* 69: 58-178.

Sinkins W.G., Vaca L., Hu Y., Kunze D.L., Schilling W.P. 1996. The COOH-terminal domain of *Drosophila* TRP channels confers thapsigargin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 271: 2955-2960.

Sitsapesan R. 1999. Similarities in the effects of DIDS, DBDS and suramin on cardiac ryanodine receptor function. *J. Membrane Biol.* 168: 159-168.

Sitsapesan R., Williams A.J. 1996. Modification of the conductance and gating properties of ryanodine receptors by suramin. *J. Membrane Biol.* 153: 93-103.

Smrcka A.V., Hepler J.R., Brown K.O., Sternweis P.C. 1991. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q . *Science.* 251: 804-807.

Smrcka A.V., Sternweis P.C. 1993. Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase $\text{C}\beta$ by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 268: 9667-9674.

Snyderman R., Uhing R.J. 1992. Chemoattractant stimulus response coupling. In: *Inflammation: Basic Principles and clinical Correlates*. Eds: Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R. N.Y. Raven: 421-440.

Soldatov N.M., Zuhlke R.D., Bouron A., Reuter H. 1997. Molecular structures involved in L-type calcium channel inactivation. *J. Biol. Chem.* 272: 3560-3566.

Somasundaram B., Norman J.C., Mahaut-Smith M.P. 1995. Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochem. J.* 309: 725-729.

Somers S.D., Mastin J.P., Adams D.O. 1983. The binding of tumor cells by murine mononuclear phagocytes can be divided into two, qualitatively distinct types. *J. Immunol.* 131: 2086-2093.

Sorota S. 1995. Tyrosine protein kinase inhibitors prevent activation of cardiac swelling-induced chloride current. *Eur. J. Physiol.* 431: 178-185.

Spedding M., Paoletti R. 1992. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.* 44: 363-376.

Spiegel A., Backlund P.S., Butrynski J.E., Jones T.L.Z., Simonds W.F. 1991. The G protein connection: molecular basis of membrane association. *TIBS*. 16: 338-341.

Sprang St. R. 1997. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 639-678.

Stahlhut M., Van Deurs B. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell*. 11: 325-337.

Steinman R.M., Cohn Z.A. 1974. The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. In: *The Inflammatory Process*. N.Y.: Academic Press. 2nd ed. 1: 449-510.

Steinman R.M., Mellman I.S., Muller W.A., Cohn Z.A. 1983. Endocytosis and recycling of plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 96: 1-27.

Sternweis P.C. 1986. The purified α subunits of G_0 and G_i from bovine brain require $\beta\gamma$ for association with phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 261: 631-637.

Sternweis P.C., Pang I.-H. 1990. The G-protein-channel connection. *TIBS*. 13: 122-126.

Stokes D.L., Wagenknecht T. 2000. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum. Structure and function of Ca^{2+} -ATPase and the ryanodine receptor. *Eur. J. Biochem.* 267: 5274-5279.

Stossel T.P. 1981. Actin filaments and secretion: the macrophage model. *Meth. Cell Biol.* 23: 215-230.

Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I. 1983. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*. 306: 67-69.

Streuli M. 1996. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 182-188.

Strigrow F., Ehrlich B.E. 1996a. Ligand-gated calcium channels inside and out. *Current Opin. Cell Biol.* 8: 490-495.

Strigrow F., Ehrlich B.E. 1996b. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of cerebellum. Mn^{2+} permeability and regulation by cytosolic Mn^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 108: 115-124.

Strigrow F., Ehrlich B.E. 1997. Regulation of intracellular calcium release channel function by arachidonic acid and leukotriene B₄. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 413-418.

Sugiyama T., Matsuda Y., Mikoshiba K. 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor associated with focal contact cytoskeletal proteins. *FEBS Lett.* 466: 29-34.

Suki W., Abramovitz J., Mattera R., Codina J., Birnbaumer L. 1987. The human genome encodes at least three non-allelic G proteins with α -type subunits. *FEBS Lett.* 220: 187-192.

Sun H.Q., Lin K.M., Yin H.L. 1997. Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J. Cell Biol.* 138: 811-820.

Sun H., Tonks N.K. 1994. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 19: 480-485.

Supattapone S., Danoff S.K., Theibert A., Joseph S.K., Steiner J., Snyder S.H. 1988a. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a brain inositol trisphosphate receptor decreases its release of calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8747-8750.

Supattapone S., Worley P.F., Baraban J.M., Snyder S.H. 1988b. Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 1530-1534.

Superti-Furga G. 1995. Regulation of the src protein tyrosine kinase. *FEBS Lett.* 369: 62-66.

Superti-Furga G., Courtneidge S.A. 1995. Structure-function relationships in src family and related protein tyrosine kinases. *Bio Essays.* 17: 321-330.

Sutherland E. 1972. Studies on the mechanism of hormone action. *Science.* 177: 401-408.

Sutherland E., Rall T. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* 232: 1077-1091.

Swarup G., Cohen S., Garbers D.L. 1982a. Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1104-1109.

Swarup G., Speeg K.V., Cohen S., Garbers D.L. 1982b. Phosphotyrosyl-protein phosphatase of TCRC-2 cells. *J. Biol. Chem.* 257: 7298-7301.

Swope S.L., Moss S.J., Blackstone C.D., Haganir R.L. 1992. Phosphorylation of ligand-gated ion channels: a possible mode of synaptic plasticity. *FASEB J.* 6: 2514-2523.

Swope S.L., Qu Z., Haganir R.L. 1995. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases. Diversity of interacting receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 757: 197-214.

Takahashi A., Camacho P., Lechleiter J.D., Herman B. 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* 79: 1089-1125.

Takahashi M., Seagar M., Jones J., Reber B., Catterall W.A. 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5478-5482.

Takayama K., Kudo I., Kim D.K., Nagata K., Nozawa Y., Inoue K. 1991. Purification and characterization of human platelet phospholipase A₂ which preferentially hydrolyzes an arachidonoyl residue. *FEBS Lett.* 282: 326-330.

Takeshima H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H. et al. 1989. Primary structure and expression from

complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*. 339: 439-445.

Tanabe N., Nukada T., Nishikawa Y., Sugimoto K., Suzuki H., Takahashi H., Nada M., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Numa S. 1985. Primary structure of the alpha-subunit of transducin and its relationship to ras proteins. *Nature*. 315: 242-245.

Tang W.-J., Gilman A.G. 1991. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science*. 254: 1500-1503.

Tepel M., Kuhnappel S., Theilmeyer G., Teupe C., Schlottmann R., Zidek W. 1994. Filling state of intracellular Ca^{2+} pools triggers transplasma membrane Na^+ and Ca^{2+} influx by a tyrosine kinase dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 26239-26242.

Tertyshnikova S., Fein A. 1998. Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 1613-1617.

Thastrup O., Cullen P.J., Drobak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 87: 2466-2470.

Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B., Hanley M.R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*. 27: 17-23.

Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B., Hanley M.R. 1994. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*. 43: 187-193.

Thomas D., Hanley M.R. 1995. Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 6429-6432.

Tibbs V.C., Gray P.C., Catterall W.A., Murphy B.J. 1998. AKAP15 anchors cAMP-dependent protein kinase to brain Na channels. *J. Biol. Chem.* 273: 25783-25788.

Tinker A., Williams A.J. 1993. Charged local anesthetics block ionic conduction in the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Biophys. J.* 65: 852-864.

Tomic S., Greiser U., Lammers R., Kharitonov A., Imyanov E., Ullrich A., Bohmer F.-D. 1995. Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 270: 21277-21284.

Tonks N.K., Neel B.G. 1996. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*. 87: 365- 368.

Trepakova E.S., Csutora P., Hunton D.L., Marchase R.B., Cohen R.A., Bolotina V.M. 2000. Calcium influx factor (CIF) directly activates store-operated calcium channels in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 275: 26158-26163.

Treves S., De Mattei M., Lanfredi M., Villa A., Green G., Mac Lennan D.H., Meldolesi J., Pozzan T. 1990. Calreticulin is a candidate for a calsequestrin-like function in Ca^{2+} -storage compartments (calciosomes) of liver and brain. *Biochem. J.* 271: 473-480.

Tripp C.S., Leahy K.M., Needleman P. 1985a. Thromboxane synthase is preferentially conserved in activated mouse peritoneal macrophages. *J. Clin. Invest.* 76: 898-901.

Tripp C.S., Mahoney M., Needleman P. 1985b. Calcium ionophore enables soluble agonists to stimulate macrophage 5-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 260: 5895.

Tsakiridis Th., Wang Q., Taha C., Grinstein S., Downey G., Klip A. 1997. Involvement of the actin network in insulin signalling. In: Cytoskeletal regulation of membrane function. Rockefeller Univ. Press, 257-271.

Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. 1984. Measuring and manipulating cytosolic Ca^{2+} with trapped indicators. *Trends Biochem. Sci.* 9: 263-266.

Tsukamoto A., Kaneko Y. 1993. Thapsigargin, a Ca^{2+} -ATPase inhibitor, depletes the intracellular Ca^{2+} pool and induces apoptosis in human hepatoma cells. *Cell Biol. Int.* 17: 969-970.

Turk J., Colca J.R., De Daniel M.L. 1985. Arachidonic acid metabolism in isolated pancreatic islets. III. Effects of exogenous lipoxygenase products and inhibitors on insulin secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 834: 23-36.

Uehara T., Fukazawa H. 1991. Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein tyrosine kinases. *Meth. Enzymol.* 201: 370-379.

Uehara Y., Fukazawa H., Murakami Y., Mizuno S. 1989. Irreversible inhibition of v-src tyrosine kinase activity by herbimycin A and its abrogation by sulfhydryl compounds. *Biochem. Res. Commun.* 163: 803-809.

Uehara Y., Murakami Y., Suzukake-Tsuchiya K., Moriya Y., Sano H., Shibata K., Omura S. 1988. Effects of herbimycin derivatives on src oncogen in relation to antitumor activity. *J. Antibiot.* 41: 831-834.

Ullrich A., Schlessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61: 203-212.

Umezawa K., Hori T., Tajima H., Imoto M., Isshiki K., Takeuchi T. 1990. Inhibition of epidermal growth factor-induced DNA synthesis by tyrosine kinase inhibitors. *FEBS Lett.* 260: 198-200.

Umezawa H., Imoto M., Sawar T., Issihiki K., Matsuda N., Uchida T., Finuma H., Hamada M., Takeuchi T. 1986. Studies on a new epidermal growth factor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH435-hF3. *J. Antibiot.* 39: 170-173.

Vaca L., Sinkins W.G., Hu Y., Kunze D.L., Schilling W.P. 1994. Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Amer. J. Physiol.* 267: C1501-C1505.

Vadas P., Stefanski E., Pruzanski W. 1985. Characterization of extracellular phospholipase A₂ in rheumatoid synovial fluid. *Life Sci.* 36: 579-587.

Van der Zee L., Nelemans A., Den Hertog A. 1995. Arachidonic acid is functioning as a second messenger in activating the Ca²⁺ entry process on H₁-histaminoceptor stimulation in DDT₁MF-2 cells. *Biochem. J.* 305: 859-864.

Voets T., Prenen J., Fleig A., Vennekens R., Watanabe H., Hoenderop J.G.J., Bindels R.J.M., Droogmans G., Penner R., Nilius B. 2001. CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J. Biol. Chem.* 276: 47767-47770.

Vogel W., Lammers R., Huang J., Ullrich A. 1993. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science.* 259: 1611-1614.

Vostal J.G., Jackson W.L., Shulman N.R. 1991. Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of specific platelet proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 16911-16916.

Vostal J.G., Shulman N.R. 1992. Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of vinculin in platelets. *FASEB J.* 6: A1761.

Wahl M.I., Jones G.A., Nishibe S., Rhee S.G., Carpenter G. 1992. Growth factor stimulation of phospholipase C-gamma 1 activity. Comparison properties of control and activated enzymes. *J. Biol. Chem.* 267: 10447-10456.

Waldman S.A., Murad F. 1987. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39: 163-196.

Walton K.M., Dixon J.E. 1993. Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 101-120.

Wang Y.-L. 1991. Dynamics of the cytoskeleton in live cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 27-32.

Wang J.S., Coburn J.P., Tauber A.I., Zaner K.S. 1997. Role of gelsolin in actin depolymerization of adherent human neutrophils. *Mol. Biol. Cell.* 8: 121-128.

Watanabe M., Shisido Y., Hirasawa N., Mue S., Fujiki H., Ohuchi K. 1992. Stimulation of arachidonic acid metabolism by a streptococcal preparation (OK-432) in rat peritoneal macrophages. *Biochim. biophys. acta.* 1138: 157-161.

Watras J., Bezprozvanny I., Ehrlich B. 1991. Inositol-1,4,5-trisphosphate-gated channels in cerebellum: presence of multiple conductance states. *J. Neurosci.* 11: 3239-3245.

Webb J.L. 1966. Arsenicals. In: *Enzymes and Metabolic inhibitors*. N.Y.: Acad. Press. 3: 595-793.

Weiss B.A., Insel P.A. 1991. Intracellular Ca^{2+} and protein kinase C interact to regulate α_1 -adrenergic- and bradykinin receptor-stimulated phospholipase A_2 activation in madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 266: 2126-2133.

Wells I., Marnett L.J. 1992. Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthase by N-acetylimidazole: comparison to acetylation by aspirin. *Biochemistry.* 31: 9520-9525.

Wenzel-Seifert R., Krautwurst D., Musgrave I., Seifert R. 1996. Thapsigargin activates univalent- and bivalent-cation entry in human neutrophils by a $\text{SK}\alpha\text{F96365}$ - and Gd^{3+} - sensitive pathway and is a partial secretagogue: involvement of pertussis-toxin-sensitive G-proteins and protein phosphatases 1/2A and 2B in the signal-transduction pathway. *Biochem. J.* 314: 679-686.

Wes P.D., Chevesich J., Jeromin A., Rosenberg C., Stetten G. 1995. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9652 - 9656.

Wey H.E., Baxter C.S. 1986. Phorbol diester synergistically stimulates agonist-induced lipoxygenase product formation in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 861.

Whatley R.E., Nelson P., Zimmerman G.A., Stevens D.L., Parker C.J., McIntyre T.M., Prescott S.M. 1989. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. The role of Ca^{2+} and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264: 6325-6333.

Whatley R.E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Prescott S.M. 1990. Lipid metabolism and signal trasduction in endothelial cells. *Prog. Lipid Res.* 29: 45-63.

White M.F. 1996. The IRS-signaling system in insulin and cytokine action. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 351: 181-189.

White M.F., Kahn C.R. 1994. The insulin signaling system. *J. Biol.Chem.* 269: 1-5.

White M.F., Shoelson S.E., Keutmann H., Kahn C.R. 1988. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 2969-2980.

Wijetunge S., Aalkjaer C., Schachter M., Hughes A.D. 1992. Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 189: 1620-1623.

Wijetunge S., Hughes A.D. 1995a. Effect of platelet-derived growth factor on voltage-operated calcium channels in rabbit isolated ear artery cells. *British J. Pharmacol.* 115: 534-538.

Wijetunge S., Hughes A.D. 1995b. pp60c-src increases voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 217: 1039-1044.

Wijkander J., Sundler R. 1989. A phospholipase A₂ hydrolyzing arachidonoylphospholipids in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 244: 51-56.

Wijkander J., Sundler R. 1991. An 100-kDa arachidonate-mobilizing phospholipase A₂ in mouse spleen and the macrophage cell line J774. Purification, substrate interaction and phosphorylation by protein kinase C. *Eur. J. Biochem.* 202: 873-880.

Wijkander J., Sundler R. 1992. Macrophage arachidonate-mobilizing phospholipase A₂: role of Ca²⁺ for membrane binding but not for catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 118-124.

Wolf B.A., Turk J., Sherman W.R., Mc Daniel M.L. 1986. Intracellular Ca²⁺ mobilization by arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 261: 3501-3511.

Wu S., Sangerman J., Li M., Brough G.H., Goodman S.R., Stevens T. 2001. Essential control of an endothelial cell I_{50C} by the spectrin membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 154: 1225-1234.

Wyatt T.A., Lincoln T.M., Pryzwansky K.B. 1991. Vimentin is transiently co-localized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 21274-21280.

Xi D., Van Dolah F.M., Ramsdell J.S. 1992. Maitotoxin induces a calcium dependent membrane depolarization in GH4C1 pituitary cells via activation of type L voltage dependent calcium channels. *J. Biol. Chem.* 267: 25025-25031.

Xiao Y.-F., Huang L., Morgan J.P. 1998. Cytochrome P450: a novel system modulating Ca²⁺ channels and contraction in mammalian heart cells. *J. Physiol.* 508.3: 777-792.

Xu X., Kitamura K., Lau K.S., Muallem Sh., Miller R.T. 1995. Differential regulation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ influx by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 29169-29175.

Xu T., Naraghi M., Kang H., Neher E. 1997. Kinetic studies of Ca²⁺ binding and Ca²⁺ clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys. J.* 73: 532-547.

Xu X., Star R.A., Tortorici G., Muallem S. 1994. Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca²⁺ influx. *J. Biol. Chem.* 269: 12645-12653.

Xu L., Tripathy A., Pasek D.A., Meissner G. 1999. Ruthenium red modifies the cardiac and skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274: 32680-32691.

Yaish P., Gazit A., Gilon C., Levitzki A. 1988. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science.* 242: 933-935.

Yang J., Ellinor P.T., Sather W.A., Zhang J.F., Tsien R.W. 1993. Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature*. 366: 158 - 161.

Yang L.J., Rhee S.G., Williamson J.R. 1994. Epidermal growth factor-induced activation and translocation of phospholipase C- γ 1 to the cytoskeleton in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 7156-7162.

Yao Y., Ferrer-Montiel A.V., Montal M., Tsien R.Y. 1999. Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell*. 98: 475-485.

Yatani A., Codina J., Mattera R., Birnbaumer L., Brown A.M. 1988. Direct G-protein gating of ionic channels. *Progr. Endocrinol.* Amsterdam. Elsevier: 1009-1016.

Yatsunami K., Pandya B.V., Oprian D.D., Khorana H.G. 1985. cDNA-derived amino acid sequence of the gamma subunit of GTPase from bovine rod outer segments. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 82: 1936-1940.

Yau K.-W. 1994. Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 3481-3483.

Yeung Y.-G., Wang Y., Einstein D.B., Lee P.S.W., Stanley E.R. 1998. Colony-stimulating factor-1 stimulates the formation of multimeric cytosolic complexes of signaling proteins and cytoskeletal components in macrophages. *J. Biol. Chem.* 273: 17128-17137.

Yoshimoto T., Furukawa M., Yamamoto S., Horie T., Watanabe-Kohno S. 1983. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116: 612-618.

Yoshimoto T., Yokoyama Ch., Ochi K., Yamamoto Sh., Maki Y., Ashida Y., Terao Sh., Shiraishi M. 1982. 2,3,5-trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadienyl)-1,4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis. *Biochim. biophys. acta*. 713: 470-473.

Yue L., Peng J.-B., Hediger M.A., Clapham D.E. 2001. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*. 410: 705-709.

Yule D.I., Kim E.T., Williams J.A. 1994. Tyrosine kinase inhibitors attenuate "capacitative" Ca^{2+} influx in rat pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1697-1704.

Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D., Nargeot J., Snutch T.P. 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α 1 subunit. *Nature*. 385: 442-446.

Zhang J.-F., Ellinor P.T., Aldrich R.W., Tsien R.W. 1994. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature*. 372: 97-100.

Zhang J.-F., Randall A.D., Ellinor P.T., Horne W.A., Sather W.A., Tanabe T., Schwarz T.L., Tsien R.W. 1993. Distinctive pharmacology and

kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels had their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*. 32: 1075-1088.

Zhang J.-Z., Wu Y., Williams B.Y., Rodney G., Mandel F., Strasburg G.M., Hamilton S.L. 1999. Oxidation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel alters calmodulin binding. *Amer. J. Physiol.* 276: C46-C53.

Zhong J., Hume J.R., Keef K.D. 1999. Anchoring protein is required for cAMP-dependent stimulation of L-type Ca^{2+} channels in rabbit portal vein. *Amer. J. Physiol.* 277: C840-C844.

Zhong L., Inesi G. 1998. Role of the S3 stalk segment in the thapsigargin concentration dependence of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase inhibition. *J. Biol. Chem.* 273: 12994-12998.

Zhu X., Birnbaumer L. 1998. Calcium channels formed by mammalian trp homologues. *News Physiol. Sci.* 13: 211-217.

Zhu X., Chu P.B., Peyton M., Birnbaumer L. 1995. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett.* 373: 193-198.

Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L. 1996. Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell*. 85: 661-671.

Zorzato F., Fuji J., Otsu K., Phillips M., Green M.N., Lai F.A., Meissner G., Mac Lennan D.H. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265: 2244-2256.

Zubov A.I., Kaznacheeva E.V., Nikolaev A.V., Alexcenko V.A., Kiselyov K., Muallem Sh., Mozhayeva G.N. 1999. Regulation of the miniature plasma membrane Ca^{2+} channel I_{min} by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 274: 25983-25985.

Zweifach A., Lewis R.S. 1993. Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 6295-6299.

Zweifach A., Lewis R.S. 1995a. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{crac}) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* 105: 209-226.

Zweifach A., Lewis R.S. 1995b. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270: 14445-14451.

Оглавление

1. Введение.....	3
2. Структурно-функциональная организация мембранных рецепторов.....	3
2.1. Суперсемейство лиганд-управляемых рецепторов-каналов.....	4
2.2. Суперсемейство рецепторов, связанных с G-белками.....	5
3. Структурно-функциональная организация G-белков.....	9
3.1. Структура G-белков.....	10
3.2. Регуляция активности G-белков.....	12
3.3. Связь G-белков с мембраной.....	14
4. Структурно-функциональная организация сигнальных систем в клетках.....	15
4.1. Аденилатциклазный путь передачи информации.....	15
4.1.1. Структура и регуляция аденилатциклазы.....	17
4.1.2. Структура и регуляция протеинкиназы A.....	20
4.2. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала.....	22
4.2.1. Структура и регуляция фосфолипазы C.....	27
4.2.2. Фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP ₂).....	29
4.2.3. Структура и регуляция протеинкиназы C.....	32
4.3. Арахидоновая кислота и ее продукты: участие в процессах внутриклеточной сигнализации.....	34
4.3.1. Механизмы образования свободной арахидоновой кислоты в клетках.....	35
4.3.2. Метаболизм арахидоновой кислоты.....	36
4.3.3. Метаболизм арахидоновой кислоты в макрофагах.....	41
4.3.4. Жирные кислоты и модуляция активности ионных каналов.....	50
4.4. Тирозинкиназы и тирозинфосфатазы.....	54
4.4.1. Рецепторы с тирозинкиназной активностью.....	55
4.4.2. Нересепторные тирозинкиназы.....	62
4.4.3. Тирозинфосфатазы.....	66
4.4.4. Ингибиторы тирозинкиназ и тирозинфосфатаз.....	67
4.4.5. Модуляция активности ионных каналов тирозинкиназами и тирозинфосфатазами.....	71
4.5. Гуанилатциклазная система.....	74
4.6. Заключение по разделу 4.....	79
5. Механизмы Ca ²⁺ -сигнализации в клетках.....	82
5.1. Ca ²⁺ - универсальный вторичный мессенджер.....	82
5.2. Механизмы мобилизации Ca ²⁺ из внутриклеточных депо.....	84
5.2.1. Ca ²⁺ - депо мышечных клеток.....	85
5.2.1.1. Биофизические характеристики и регуляция рианодин-чувствительных Ca ²⁺ -каналов.....	86
5.2.1.2. Структура рианодинового рецептора.....	89

5.2.2. Ca^{2+} -депо немышечных клеток.....	92
5.2.2.1. Структура IP_3 -рецептора.....	97
5.2.2.2. Регуляция активности IP_3 -рецептора.....	99
5.2.2.3. Биофизические характеристики IP_3 -чувствительных каналов Ca^{2+} -выброса.....	101
5.3. Механизмы входа Ca^{2+} в клетки.....	103
5.3.1. Типы и структурно-функциональная организация потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов.....	103
5.3.1.1. Структура Ca^{2+} -каналов.....	106
5.3.1.2. Модуляция активности Ca^{2+} -каналов.....	112
5.3.2. Механизмы входа Ca^{2+} в невозбудимые клетки.....	117
5.3.2.1. Депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетки.....	117
5.3.2.2. Модели депо-зависимого входа Ca^{2+} в клетки.....	121
5.3.2.3. Биофизические характеристики и механизмы регуляции депо-зависимых Ca^{2+} -каналов.....	135
5.3.2.4. Молекулярная природа депо-зависимых Ca^{2+} -каналов.....	140
5.3.2.5. Функциональная роль депо-зависимого входа Ca^{2+}	146
5.3.2.6. Возможная роль депо-зависимого входа Ca^{2+} в различных патологических процессах.....	147
5.4. Механизмы Ca^{2+} -сигнализации в перитонеальных макрофагах.....	148
5.5. Заключение по разделу 5.....	152
6. Список литературы.....	155

Научное издание

Крутецкая Зоя Иринарховна
 Лебедев Олег Евгеньевич
 Курилова Лидия Сергеевна

МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

Подписано в печать 27.02.03. Формат 60х84 1/16. Печать
 офсетная. Бумага офсетная. Усл. печ. л. 12,09. Уч.-изд. л. 12,75.

Тираж 200 экз. Заказ 34

ЦОП типографии Издательства СПбГУ.
 199034, С.-Петербург, наб. Макарова, 6.